

# **Charakterisierung eines modularen und proteinbasierten Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Daniel Grum

aus Herne

Februar 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Strukturelle und Medizinische Biochemie am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Hoffmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Christian Herrmann (Ruhr-Universität Bochum)

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hardy Pfanz

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Magnetresonanztomographie und Krebs .....	1
1.2 Einfluss Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel auf die longitudinale Relaxationszeit von Wasserstoffkernen in einem magnetischen Feld .....	4
1.2.1 Eigenschaften der longitudinalen Relaxation von Atomkernen in externen Magnetfeldern .....	4
1.2.2 Mechanismen der Beschleunigung der $T_1$ -Relaxationsrate $R_1$ von Wasserstoff- kernen durch die Anwesenheit Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel .....	7
1.2.3 Quantifizierung des Relaxationseffektes Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel .....	9
1.3 Ansätze zur Verbesserung Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel .....	14
1.3.1 Theorie .....	14
1.3.2 Praktische Umsetzungen in der Literatur .....	15
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Chemikalien .....	19
2.2 Puffer und Lösungen für Standardmethoden .....	19
2.3 Nährmedien für die Bakterienanzucht .....	21
2.4 Bakterienstämme und humane Zelllinien .....	21
2.5 Verwendetes Plasmid .....	22
2.6 Enzyme .....	23
2.7 Kits .....	23
2.8 Weitere Verbrauchsmaterialien .....	23
2.9 Wiederverwertbare Materialien .....	25
2.10 Geräte .....	25
2.11 Software .....	27
2.12 Klonierungen .....	27
2.13 Einführen von Punktmutationen .....	31
2.14 Expression des GST-Zarvin sowie der entsprechenden Z- und Parvalbumin- Domänen Konstrukte .....	31
2.15 Reinigung des Zarvins sowie der Z- und Parvalbumin-Domäne .....	32
2.16 Quantifizierung von Proteinkonzentrationen .....	34
2.17 MALDI-Massenspektrometrie .....	34

2.18 CD-Spektroskopie .....	35
2.19 NMR-Spektroskopie .....	36
2.20 Analytische Gelfiltration.....	37
2.21 Anionenaustausch-Chromatographie .....	37
2.22 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Zarvin und Cetuximab .....	38
2.22.1 Kopplung von Atto465-NHS an Zarvin .....	38
2.22.2 Kopplung von 1,5-IAEDANS-Iodacetamid an Zarvin-S146C.....	39
2.22.3 Kopplung von Atto594-Maleimid an Zarvin-D72C.....	39
2.22.4 Kopplung von Atto488-NHS an Cetuximab.....	39
2.23 Titrations mit Detektion der Fluoreszenzanisotropie.....	40
2.23.1 Titration von Zarvin-Atto465 mit Cetuximab .....	40
2.23.2 Titrations von Zarvin-S146C-AEDANS mit Cetuximab.....	41
2.24 Zellkultur und Fluoreszenzmikroskopie .....	41
2.25 Terbium(III)-Lumineszenz und Metallionen-Titrations.....	43
2.25.1 Grundlagen der Terbium(III)-Lumineszenz .....	43
2.25.2 Metallionen-Titrations auf Basis der Terbium(III)-Lumineszenz.....	46
2.26 Relaxometrie .....	48
2.27 Nichtlineare Regression mit kinetischen Daten .....	49
2.28 Dissoziationskinetiken des Zarvin:(Tb <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> -Komplexes.....	50
2.29 FRET-Kinetiken.....	50
2.30 Kovalente Verknüpfung von Zarvin und Cetuximab .....	51
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
3.1 Klonierung von Zarvin und dessen einzelner Domänen .....	53
3.2 Expression und Reinigung von Zarvin und seiner einzelnen Domänen .....	55
3.3 Faltungseigenschaften von Zarvin.....	57
3.3.1 CD-Spektroskopie.....	57
3.3.2 NMR-Spektroskopie .....	58
3.4 Zarvin ist ein Monomer .....	62
3.5 Funktionalität der Z-Domäne des Zarvins .....	63
3.6 Funktionalität des Komplexes bestehend aus Zarvin und einem IgG-Antikörper .....	67
3.7 Affinität der Parvalbumin-Domäne des Zarvins für Lanthanoide .....	71
3.7.1 Etablierung eines Terbiumlumineszenz-Systems .....	71
3.7.2 Affinitätsbestimmung der Bindung von Terbium(III) an Zarvin.....	75
3.7.3 Affinitätsbestimmung der Bindung von Gadolinium(III) an Zarvin.....	78
3.8 Untersuchung der Relaxationseigenschaften von Zarvin im MRT .....	79
3.9 Stabilität von Zarvin.....	83
3.9.1 Stabilität von Zarvin gegenüber proteolytischem Abbau.....	83
3.9.2 Thermische Stabilität von Zarvin .....	84
3.10 Kinetische Stabilität des Komplexes aus Zarvin und Terbium(III) .....	87



3.11 Kinetische Stabilität der Bindung von Zarvin an einen Antikörper .....	89
3.12 Kovalente Verknüpfung von Zarvin und Cetuximab .....	93
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>96</b>
4.1 Analyse der Relaxivitäten von Zarvin:(Gd <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> .....	97
4.2 Analyse des <i>in vitro</i> geschätzten Detektionslimits von Zarvin .....	104
4.3 Kinetische Stabilität der Zarvin:Lanthanoid-Interaktion .....	105
4.4 Interaktion des Zarvins mit Antikörpern .....	107
4.4.1 Die kinetische Stabilität der nichtkovalenten Interaktion .....	107
4.4.2 Die kovalente Verknüpfung mit Hilfe eines <i>Crosslinkers</i> .....	109
4.5 Ausblick.....	112
<b>5. Zusammenfassung / Abstract .....</b>	<b>114</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>128</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>148</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>Erklärungen .....</b>	<b>150</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Å.....	Ångström
Abb .....	Abbildung
A.U. ....	<i>Arbitrary Units</i> (Willkürliche Einheiten)
$\vec{B}_0$ .....	Vektorgröße eines externen Magnetfeldes $B_0$
BMBF .....	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMRB .....	<i>Biological Magnetic Resonance Bank</i>
bp.....	Basenpaar(e)
BSA.....	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw. ....	beziehungsweise
bspw. ....	beispielsweise
ca. ....	circa
Ca <sup>2+</sup> .....	zweifach positiv geladenes Calciumion
CD .....	Circulardichroismus
CT.....	Computertomographie
$\gamma_I$ .....	Gyromagnetisches Verhältnis für das Proton
$\gamma_S$ .....	Gyromagnetisches Verhältnis für das Elektron
Da.....	Dalton
d.h.....	das heißt
DOTA.....	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DSSP.....	<i>Define Secondary Structure of Proteins</i> (Algorithmus)
DTPA .....	Diethylentriaminpentaessigsäure
E <sub>A</sub> .....	Aktivierungsenergie
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia Coli</i>
E <sup>dip</sup> .....	dipolare Interaktionsenergie
EGF.....	<i>Epidermal Growth Factor</i>
evtl.....	eventuell
ε .....	Extinktionskoeffizient
F <sub>C</sub> .....	konstanter Bereich eines Antikörpers
FPLC .....	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FRET .....	Förster/Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
ΔG <sup>‡</sup> .....	freie oder Gibbs Aktivierungsenergie
g <sub>e</sub> .....	Elektronen(spin) g-Faktor
g <sub>I</sub> .....	Protonen g-Faktor
Gd <sup>3+</sup> .....	dreifach positiv geladenes Gadoliniumion
Gl. ....	Gleichung
GSH .....	Glutathion
GST.....	Glutathion-S-Transferase
ΔH <sup>‡</sup> .....	Enthalpieänderung bei der Dissoziation eines Übergangszustandes
HSA .....	Humanes Serumalbumin

1,5-IAEDANS	.....5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)Naphthalen-1-Sulfonsäure
IC <sub>50</sub>	.....mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	.....Immunglobulin G
IPTG	.....Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
j	.....Drehimpulsquantenzahl
J	.....Gesamt-Drehimpulsquantenzahl
$\vec{J}_I$	.....Spindrehimpuls eines Protons oder Atomkerns
$\vec{J}_S$	.....Spindrehimpuls eines Elektrons oder Mehrelektronensystems
k <sub>B</sub>	.....Boltzmann-Konstante
kDa	.....Kilodalton
K <sub>D</sub>	.....Dissoziationskonstante
KM	.....Kontrastmittel
k <sub>off</sub>	.....Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
L	.....Gesamt-Bahndrehimpulsquantenzahl
l	.....Bahndrehimpulsquantenzahl
ln	.....natürlicher Logarithmus
log <sub>10</sub>	.....dekadischer Logarithmus
M	.....Molar (1 mol/Liter)
$\vec{M}$	.....makroskopisch messbares magnetisches Moment
M <sub>I</sub>	.....Gesamt-Spinquantenzahl eines Atomkerns
M <sub>S</sub>	.....Gesamt-Spinquantenzahl eines Mehrelektronensystems
MALDI	..... <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
mAU	.....milli <i>Absorption Units</i>
MCS	..... <i>Multiple Cloning Site</i>
min	.....Minute
MD	.....Moleküldynamik
m <sub>I</sub>	.....Magnetquantenzahl
mM	.....Millimolar (1 millimol/Liter)
μM	.....Mikromolar (1 mikromol/Liter)
MRT	.....Magnetresonanztomograph(ie)
MRW	..... <i>Mean Residue weight</i>
m/z	.....Masse-Ladungs-Verhältnis
μs	.....Mikrosekunde
ms	.....Millisekunde
μ <sub>B</sub>	.....Bohrsches Magneton
μ <sub>N</sub>	.....Kernmagneton
$\vec{\mu}_I$	.....magnetisches Moment eines Protons oder Atomkerns
$\vec{\mu}_S$	.....magnetisches Moment eines Elektrons oder Mehrelektronensystems
NHS	.....N-Hydroxysuccinimid
nM	.....Nanomolar (1 nanomol/Liter)
NMR	..... <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernmagnetresonanz)
NMRD	..... <i>Nuclear Magnetic Resonance Dispersion</i>

ns .....	Nanosekunde
NTA .....	Nitrilotriacetat
$\eta$ .....	Viskosität
o. ä. ....	oder ähnliche(r)(s)(em)(en)
OD <sub>600</sub> .....	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE .....	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS .....	<i>Phosphate Buffered Salt</i> (Phosphat gepuffertes Salz)
PCR .....	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pdb .....	<i>protein data bank</i>
PET .....	Positronenemissionstomographie
pI .....	Isoelektrischer Punkt
pM .....	Picomolar (1 pikomol/Liter)
PMSF .....	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm .....	<i>parts per million</i>
R .....	allgemeine Gaskonstante
R <sub>1</sub> .....	longitudinale Relaxationsrate eines Protons
r <sub>1</sub> .....	longitudinale Relaxivität
R <sub>1m</sub> .....	longitudinale Relaxationsrate eines Protons in der inneren Koordinations- sphäre eines Kontrastmittels
$\vec{r}$ .....	Distanzvektor zwischen einem Proton eines Wassermoleküls und Gd <sup>3+</sup>
S .....	Gesamt-Spinquantenzahl eines Mehrelektronensystems
s .....	je nach Kontext: Sekunde oder Spinquantenzahl
SBM .....	Solomon-Bloembergen-Morgen (Gleichungen)
SDS .....	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sog. ....	sogenannt(e)(es)(er)(en)(em)
SPECT .....	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
T .....	Tesla
T .....	Temperatur
t <sub>1/2</sub> .....	Halbwertszeit
T <sub>1</sub> .....	longitudinale Relaxationszeit eines Protons
T <sub>1m</sub> .....	longitudinale Relaxationszeit eines Protons in der inneren Koordinations- sphäre eines Kontrastmittels
T <sub>2</sub> .....	transversale Relaxationszeit eines Protons
Tab .....	Tabelle
Tb <sup>3+</sup> .....	dreifach positiv geladenes Terbiumion
TFA .....	Trifluoressigsäure
TI .....	Inversionszeit im <i>Inversion Recovery</i> Experiment
TSP .....	3-(Trimethylsilyl)propionat-D4
$\tau_c$ .....	Korrelationszeit
$\tau_m$ .....	Lebenszeit eines Wassermoleküls in der inneren Koordinatinsphäre eines Kontrastmittels
$\tau_m'$ .....	Lebenszeit eines Wassermoleküls in der zweiten Koordinatinsphäre eines Kontrastmittels

$\tau_r$ .....	Rotationskorrelationszeit
$\tau_s$ .....	Elektronenspinrelaxationszeit
$\tau_{s1}/T_{1e}$ .....	longitudinale Elektronenspinrelaxationszeit
u. a. ....	unter anderem
v. a. ....	vor allem
z. B. ....	zum Beispiel
z. T. ....	zum Teil
$\omega$ .....	Frequenz in Hertz mal $2\pi$
$\omega_I$ .....	Protonenlarmorfrequenz in Hertz mal $2\pi$
$\omega_S$ .....	Larmorfrequenz eines Elektrons oder Mehrelektronensystems in Hertz mal $2\pi$

# Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Klassische Gadolinium(III)-basierte  $T_1$ -Kontrastmittel für die MRT
- Abb. 1.2: Lorentzfunktion für zwei unterschiedliche  $\tau_c$ -Werte
- Abb. 1.3: Simulation der Solomon-Gleichung in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke und mit konstantem  $\tau_c$
- Abb. 1.4: Schnappschuss einer in der Moleküldynamik simulierten Struktur von Zarvin
- Abb. 2.1: Darstellung des für Klonierungen verwendeten DNA-Vektors pET41\_Pre
- Abb. 2.2: Verwendete DNA- und Proteinmarker
- Abb. 2.3: Verteilung der acht 4f-Elektronen des Terbium(III) auf die sieben 4f-Orbitale entsprechend den Hund'schen Regeln
- Abb. 2.4: Termschema von Terbium(III) ohne Ligandenfeld
- Abb. 3.1: Schema der Klonierung des Zarvin-Gens in den pET41\_Pre-Vektor
- Abb. 3.2: Kolonie-PCR der Ligationsansätze zur Klonierung der Z- sowie der Parvalbumin Domäne separat in den pET41\_Pre-Vektor
- Abb. 3.3: Gelfiltrationsprofil des Gemisches aus GST, Zarvin und der Abbauprodukte von Zarvin auf einer Superdex 75, 26/60 Gelfiltrationssäule
- Abb. 3.4: Schägger-Jagow-Gel und MALDI-Massenspektrum des gereinigten Zarvins
- Abb. 3.5: Fern-UV CD-Spektrum von Zarvin
- Abb. 3.6: Vergleich zwischen dem gemessenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins und den entsprechenden NH-Signalen des Wildtyp  $\alpha$ -Parvalbumins
- Abb. 3.7: Anionenaustausch-Chromatographie des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins
- Abb. 3.8: Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Zarvins, des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins sowie der Z-Domäne
- Abb. 3.9: Analytische Gelfiltration des Zarvins und der Z-Domäne
- Abb. 3.10: MALDI-Massenspektrum des gereinigten Kopplungsansatzes zur Herstellung von Zarvin-Atto465
- Abb. 3.11: Titration von ca. 120 nM Zarvin einer Zarvin-Atto465-Lösung mit Cetuximab
- Abb. 3.12: Titration von 400 nM bzw. 120 nM Zarvin einer Zarvin-S146C-AEDANS-Lösung mit Cetuximab
- Abb. 3.13: Schägger-Jagow-Gel und MALDI-Massenspektrum des Zarvin-D72C-Atto594
- Abb. 3.14: Konfokalmikroskopie der Bindung des Komplexes Cetuximab:Zarvin-D72C Atto594 an A431-Zellen
- Abb. 3.15: Kontrollen des zellbasierten Experimentes zur Überprüfung der Funktionalität des Komplexes Cetuximab:Zarvin-D72C-Atto594
- Abb. 3.16: Struktur-*Alignment* zwischen der S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin-Mutante aus der Ratte und einer Parvalbumin-Spezies aus dem Muskel des Karpfens
- Abb. 3.17: Anregungs- und Emissionsspektren von Zarvin:Tb<sup>3+</sup>, Anregungsspektrum von NTA:Tb<sup>3+</sup>
- Abb. 3.18: *Active-Site Titration* von Zarvin mit TbCl<sub>3</sub>
- Abb. 3.19: Messung der Bindungsaffinität zwischen Terbium(III) und Zarvin
- Abb. 3.20: Konkurrenzexperiment zur Abschätzung der Bindungsaffinität von Gd<sup>3+</sup> bzw. Ca<sup>2+</sup> an Zarvin

- Abb. 3.21: Auftrag der Relaxationsdifferenz  $R_1 - R_1^{\text{Puffer}}$  gegen die  $\text{Gd}^{3+}$ -Konzentration einer Verdünnungsreihe von Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  bzw. Cetuximab:Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$
- Abb. 3.22: Darstellung der Grauwerte der einzelnen Verdünnungsstufen von Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  und Cetuximab:Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  bei der Inversionszeit  $\text{TI}_0$  der Pufferkontrolle im *Inversion Recovery TSE* Experiment
- Abb. 3.23: Untersuchung des Zarvins auf proteolytische Degradation in fötalem Kälberserum
- Abb. 3.24: Thermische Stabilität von Zarvin
- Abb. 3.25: Vergleich der thermischen Stabilität von Zarvin und dessen einzelner Domänen
- Abb. 3.26: Kinetische Stabilität des Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes in Fötalem Kälberserum
- Abb. 3.27: Anregungs- und Emissionsspektren von Cetuximab-Atto488 und Zarvin-D72C Atto594
- Abb. 3.28: Titration von 200 nM Cetuximab-Atto488 mit Zarvin-D72C-Atto594
- Abb. 3.29: Temperaturabhängige Dissoziation des Cetuximab-Atto488:Zarvin-D72C-Atto594 Komplexes in Anwesenheit von unmarkiertem Cetuximab
- Abb. 3.30: Dokumentation der kovalenten Verknüpfung von Cetuximab und Zarvin mit Hilfe des heterobifunktionalen *Crosslinkers* Sulfo-LC-SDA
- Abb. 4.1: Analyse der Anzahl an Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre der CD- und der EF-Bindestelle des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins mit Hilfe einer MD-Simulation (durchgeführt von Stefan Franke)
- Abb. 4.2: *Alignment* der Aminosäuresequenzen der Parvalbumin-Spezies des Karpfens sowie des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins der Ratte
- Abb. 4.3: Ausschnitt des NMRD-Profiles von Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  mit den bei 1,5, 3 und 7 Tesla gemessenen Relaxivitäten
- Abb. 4.4: Relaxivitätsanteile der ersten, zweiten und äußeren Koordinationssphäre (KS) des Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  nach Anwendung der Grenoble-Methode
- Abb. 4.5: Vergleich zwischen der EF-Bindestelle des  $\alpha$ -Parvalbumins der Ratte und dem kleinmolekularen  $\text{T}_1$ -Kontrastmittel Dotarem<sup>®</sup>
- Abb. 4.6: Cartoon- und Oberflächen-Darstellung der Kristallstruktur 1FC2 mit weiteren möglichen Ansätzen für eine kovalente Verknüpfung eines Zarvin-Derivates mit einem IgG-Antikörper

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 3.1: Sekundärstrukturanteile von Zarvin
- Tab. 3.2: Inversionszeiten am Nulldurchgang ( $\text{TI}_0$ ) und  $\text{T}_1$ -Zeiten der einzelnen Verdünnungsstufen von Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  bei 1,5 Tesla, 3 Tesla und 7 Tesla
- Tab. 3.3: Inversionszeiten am Nulldurchgang ( $\text{TI}_0$ ) und  $\text{T}_1$ -Zeiten der einzelnen Verdünnungsstufen von Cetuximab:Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  bei 1,5 Tesla, 3 Tesla und 7 Tesla
- Tab. 3.4: Relaxivitäten  $r_1$  von Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$  und Cetuximab:Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$
- Tab. 3.5: Schmelztemperaturen von Zarvin und dessen einzelner Domänen sowie der entsprechenden  $\text{Gd}^{3+}$ -gesättigten Spezies
- Tab. 3.6:  $k_{\text{off}}$ - und  $t_{1/2}$ -Werte der Dissoziation des Cetuximab-Atto488:Zarvin-D72C-Atto594 Komplexes

# 1. Einleitung

Die vorliegende Promotionsarbeit ist Teil eines BMBF-Projektes zur Entwicklung neuer Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT). Das BMBF-Projekt hat die Bezeichnung „Strukturbasiertes Design von modularen MRT-Molekülsonden zur hochsensitiven Detektion von Metastasen“. Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines proteinbasierten Kontrastmittels, das in der Lage ist, Metastasen mit Hilfe der Magnetresonanztomographie sichtbar zu machen. Stand der Technik für die Detektion von Metastasen sind Kombinationstechniken wie PET/CT und SPECT/CT [1], welche jedoch auf Röntgenstrahlung und radioaktiven Kontrastmitteln basieren. Seit einigen Jahren bestehen daher Bemühungen, entsprechende Untersuchungen auch mit Hilfe der MRT zu ermöglichen, da diese Technik geringere Nebenwirkungen aufweist.

## 1.1 Magnetresonanztomographie und Krebs

Die Bildgebung bei der MRT basiert auf dem Verhalten der Protonen von Wassermolekülen im Körper, wenn diese einem äußeren Magnetfeld ausgesetzt werden. Dadurch erhalten die Drehimpulsvektoren der als magnetische Dipole anzusehenden Protonen (Kernspins) eine der Magnetfeldstärke entsprechende Präzessionsbewegung um die magnetischen Feldlinien (Larmorfrequenz) und führen zu einer Aufspaltung der entsprechenden Energieniveaus (Zeeman-Aufspaltung). Beim Einstrahlen eines Wechselfeldes mit geeignetem Frequenzband lassen sich Übergänge zwischen den Niveaus erzeugen (Resonanz), die sich als Absorptionsbande im Frequenzspektrum bemerkbar machen. Aufgrund des universellen Vorkommens von Wasserprotonen im Körper wird bei der MRT ein Magnetfeld angelegt, das einen Gradienten besitzt. Entlang dieses Gradienten entstehen mehrere Wassersignale auf der Frequenzachse, deren Larmorfrequenzen eine Funktion der Magnetfeldstärke an dem jeweiligen Punkt des Gradienten sind. Da der angelegte Magnetfeldgradient entlang der im Gerät liegenden Person verläuft, ist eine eindimensionale Zuordnung der einzelnen Wassersignale zu Regionen entlang des Körpers möglich. Über Veränderungen im Verlauf des Gradienten können die Wassersignale durch die Entstehung einer zweiten bis hin zu einer dritten Dimension, mit Hilfe einer Fourier-Transformation, Regionen im Körper zugeordnet werden [2]. Da verschiedene Organe und Gewebe unterschiedlich viel Wasser und damit Protonendichten enthalten, haben die einzelnen Wassersignale entlang der Gradienten unterschiedliche Intensitäten. Dadurch entsteht ein Kontrast zwischen verschiedenen Geweben und Organen auf zwei- und dreidimensionalen Bildern.

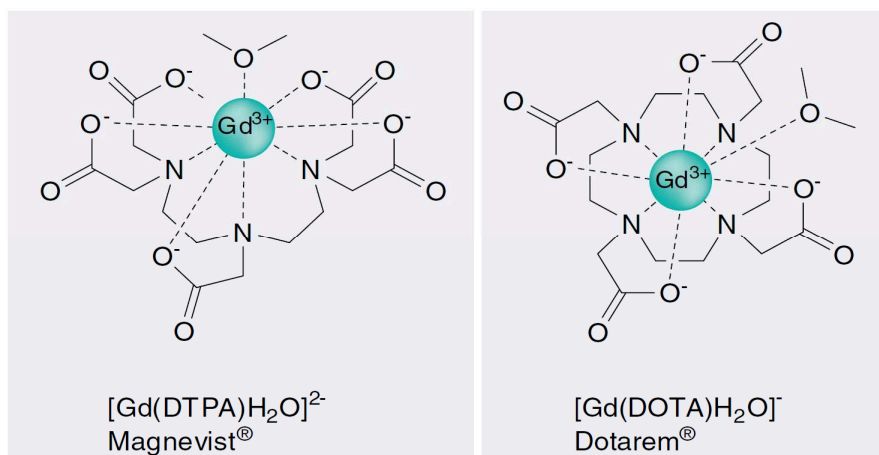


Weitere wichtige Kontrast erzeugende Eigenschaften der Protonen sind ihre Relaxationszeiten, welche ebenfalls zwischen verschiedenen Regionen im Körper variieren. Relaxationszeiten beschreiben die Zeit, die nötig ist, um aus einem durch das eingestrahlte Wechselfeld erzeugten Zustand in den Ausgangszustand zurückzukehren. Bei der Kernspinresonanz werden im Wesentlichen zwei Relaxationszeiten unterschieden, die longitudinale ( $T_1$ ) und die transversale ( $T_2$ ) Relaxationszeit [2].

In Bezug auf die Relaxationszeiten werden unterschiedliche Messungen durchgeführt, bei denen der entstehende Kontrast entweder größtenteils von der  $T_1$ - oder der  $T_2$ -Relaxationszeit beeinflusst wird. Pulssequenzen, bei denen die entsprechenden Parameter so gewählt werden, dass der Bildkontrast größtenteils durch die  $T_1$ -Zeit des Gewebes beeinflusst wird, werden als  $T_1$ -gewichtet bezeichnet. Entsprechendes gilt für die  $T_2$ -Zeit und damit sog.  $T_2$ -gewichteten Pulssequenzen [3]. Bei  $T_1$ -gewichteten Bildern werden Regionen umso heller dargestellt, je kürzer die  $T_1$ -Zeit ist (positiver Kontrast). Bei  $T_2$ -gewichteten Bildern ist dies umgekehrt (negativer Kontrast). Dort werden Regionen mit kurzer  $T_2$ -Zeit dunkel dargestellt. Je nach Indikation und sichtbar zu machendem Gewebe kann ein  $T_1$ - oder  $T_2$ -gewichtetes Bild besser geeignet sein.  $T_1$ -Gewichtung bspw. stellt besonders fettreiche Gewebe intensiv hell dar, wodurch anatomische Strukturen von Organen gut abgegrenzt werden können. Bei dieser Art der Gewichtung können daher nicht-physiologische Strukturen von z. B. soliden Tumoren gut erkannt werden [4].

Für beide Arten der Gewichtung gibt es weiterhin die Möglichkeit der Kontrasterhöhung zwischen verschiedenen Geweben durch die Injektion von Kontrastmitteln. Hierbei wird zwischen Kontrastmitteln für  $T_1$ - und  $T_2$ -gewichtete Messungen unterschieden. Kontrastmittel für  $T_1$ -Gewichtung enthalten komplexierte paramagnetische Metallionen, die in der Lage sind, sowohl die  $T_1$ - als auch die  $T_2$ -Relaxationszeit von Wasserprotonen zu verkürzen. Ein typisches Metallion für diesen Zweck ist das dreiwertige Lanthanoid Gadolinium(III) [5]. Dieses besitzt mit sieben ungepaarten Elektronen ein hohes magnetisches Moment und eine lange Elektronenspin-Relaxationszeit. Beide Eigenschaften erlauben eine effektive Relaxation von Kernspins wie z. B. denen von Protonen [6,7]. Gadolinium(III)-basierte Kontrastmittel sind in der Regel so konstruiert, dass sieben bis acht der neun Koordinationsstellen des  $Gd^{3+}$  durch ein chelatierendes Molekül (Ligandenfeld) und nur ein bis zwei Koordinationsstellen durch Wassermoleküle besetzt sind [8] (Abb. 1.1). Diese Koordination durch einen Chelator ist notwendig, da freies  $Gd^{3+}$  *in vivo* toxisch wirkt. Es kann insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion zu Fibrosen in Haut, Gelenken und inneren Organen führen [9]. Mechanismen dieser Toxizität sind bisher nicht eindeutig geklärt, hängen aber mit einer Wachstumsstimulation von Fibroblasten durch

unlösliche Gadolinium(III)-Salze zusammen [10,11]. Weiterhin hat  $\text{Gd}^{3+}$  einen sehr ähnlichen Ionenradius wie  $\text{Ca}^{2+}$  und könnte daher aufgrund seiner Dreiwertigkeit mit höherer Affinität an  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine binden, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Metabolismus gestört würde [12].



**Abb. 1.1:** Darstellung zweier klassischer Gadolinium(III)-basierter  $T_1$ -Kontrastmittel, von denen eine große Anzahl an Derivaten verfügbar ist. Magnevist® war 1988 das erste zugelassene  $T_1$ -Kontrastmittel und beinhaltet den linearen Chelator Diethylenetriaminpentaessigsäure (DTPA). Dotarem® basiert auf dem makrozyklischen Chelator DOTA, welcher mit  $\text{Gd}^{3+}$  einen der kinetisch inertesten Chelatkomplexe unter  $T_1$ -Kontrastmitteln bildet [8]. Beide Kontrastmittel binden ein Wassermolekül in der inneren Koordinationssphäre. Abbildung modifiziert nach [13].

Von paramagnetischen Metallionen wird zwar sowohl die  $T_1$ - als auch die  $T_2$ -Zeit verkürzt, allerdings ist die  $T_2$ -Zeit in allen Körpergeweben deutlich kürzer als die  $T_1$ -Zeit. Dadurch wird letztere bei gleicher prozentualer Verkürzung um einen deutlich höheren absoluten Betrag verringert.  $T_1$ -gewichtete Pulssequenzen sind besonders sensitiv für diese hohe absolute Änderung in der  $T_1$ -Relaxationszeit. Dadurch erscheinen Gewebe, zu denen das Kontrastmittel Zugang hat, sehr hell auf  $T_1$ -gewichteten Bildern [14]. Tumore werden bis zu einer gewissen Größe gut durchblutet und erscheinen deshalb in  $T_1$ -gewichteten Bildern durch den Einsatz eines  $T_1$ -Kontrastmittels hell, da sich das Kontrastmittel im Tumor gut anreichern kann (z. B. [15–17]). Für kleinere Metastasen reicht der erzeugte Kontrast klassischer  $T_1$ -Kontrastmittel allerdings nicht aus. Daher soll innerhalb des genannten BMBF-Projektes das Repertoire neuartiger tumorspezifischer  $T_1$ -Kontrastmittel erweitert werden.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ein Großteil des Abschnittes 1.1 wurde bereits wörtlich in meiner Masterarbeit verwendet, die aufgrund eines Fast-Track-Programmes innerhalb der Promotionszeit geschrieben wurde.

## 1.2 Einfluss Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel auf die longitudinale Relaxationszeit von Wasserstoffkernen in einem magnetischen Feld

Für die Entwicklung neuer und verbesserter Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel ist es wichtig, die grundlegenden Mechanismen der Verkürzung der  $T_1$ -Relaxationszeit von Wasserstoffkernen durch paramagnetische Ionen zu verstehen. Die entsprechenden Parameter, die diese Interaktion beschreiben und beeinflussen, können dann variiert werden, um die Relaxationseigenschaften eines Kontrastmittels für einen bestimmten magnetischen Feldstärkenbereich zu optimieren. Daher werden hier zunächst allgemein die Relaxationseigenschaften von Wasserstoffkernen und Elektronen in einem Magnetfeld und anschließend die Einflüsse paramagnetischer Ionen wie  $Gd^{3+}$  auf die  $T_1$ -Relaxationszeit von Wasserstoffkernen beschrieben.

### 1.2.1 Eigenschaften der longitudinalen Relaxation von Atomkernen in externen Magnetfeldern

In der MRT ist analog zur NMR-Spektroskopie nicht das Verhalten einzelner magnetischer Momente  $\vec{\mu}_i$  der Protonen von Interesse, sondern das kollektive magnetische Verhalten einer großen Anzahl in einem externen Magnetfeld. Entsprechend der Boltzmann-Verteilung sind dabei in einem Volumenelement bei Raum- oder gar Körpertemperatur nahezu gleich viele Protonen mit ihren magnetischen Momenten auf die einzelnen sog. Zeeman-Energieniveaus verteilt. Anschaulich bedeutet dies, dass sich nahezu gleich viele magnetische Momente  $\vec{\mu}_i$  entlang sowie entgegen der Magnetfeldlinien ausgerichtet haben. Ein nur geringer Überschuss in dem niedrigsten Energieniveau ( $M_I = \frac{1}{2}$  bei Wasserstoffkernen,  $M_I$ : magnetische Gesamtspinquantenzahl) induziert ein makroskopisch messbares magnetisches Moment  $\vec{M}$  in die Feldrichtung des externen Magnetfeldes  $\vec{B}_0$  (+z-Achse) [2]. Ein Radiofrequenzpuls mit der Larmorfrequenz von Wasserstoffkernen wird bei  $T_1$ -gewichteten Pulssequenzen verwendet, um die Boltzmann-Verteilung dieser Kerne zugunsten des  $M_I = -\frac{1}{2}$  Zeeman-Energieniveaus zu stören. Der Puls wird dabei meist mit einer Zeitdauer eingestrahlt, die den Vektor  $\vec{M}$  mit gleicher Intensität in die gegensätzliche Richtung von  $\vec{B}_0$  (-z-Achse) orientiert (180°-Puls im *Inversion Recovery* Experiment). Nach einer sog. Inversionszeit TI wird ein weiterer 90°-Anregungspuls verwendet, um den nach dieser Zeit noch verbleibenden Magnetisierungsanteil entlang der -z-Achse bspw. mit Hilfe einer sog. Spin-Echo-Sequenz auszulesen [3]. Je kürzer die  $T_1$ -Relaxationszeit eines Gewebes ist, umso weiter regeneriert sich die longitudinale Magnetisierung während der TI-Zeit

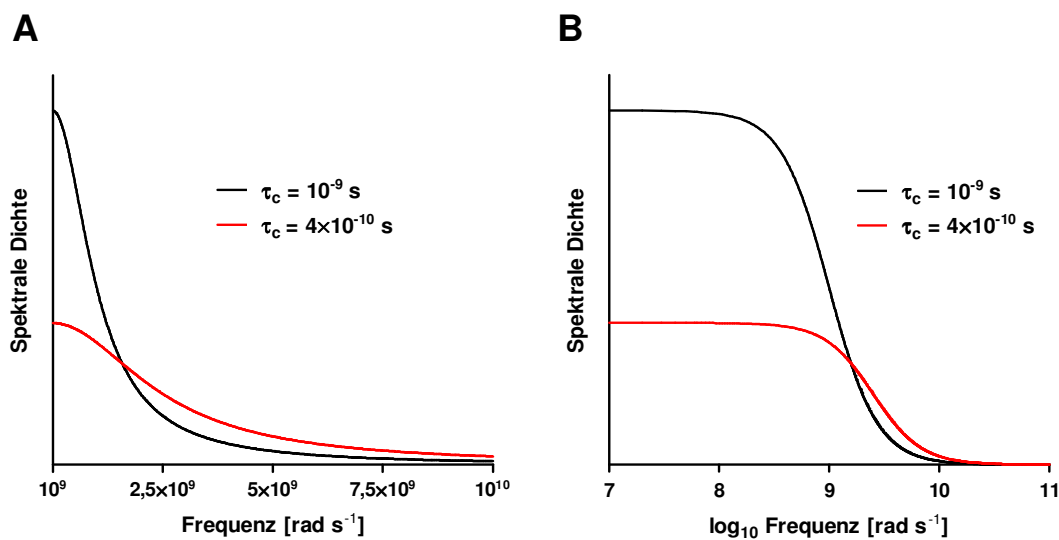
wieder in Richtung der +z-Achse des Magnetfeldes. Unterschiedliche  $T_1$ -Relaxationszeiten zwischen benachbarten Geweben sorgen daher über ungleiche longitudinale Magnetisierungen nach der TI-Zeit für einen Kontrast.

Wodurch aber wird nun die Relaxation der longitudinalen Magnetisierung während der TI-Zeit verursacht und beeinflusst? Das nach dem  $180^\circ$ -Puls aus dem Gleichgewicht gebrachte System tendiert dazu die ursprüngliche Boltzmann-Verteilung wiederherzustellen. Dazu ist es nötig, dass der Überschuss an Wasserstoffkernen, die ihr magnetisches Moment  $\vec{\mu}_1$  nun entgegengesetzt von  $\vec{B}_0$  ausgerichtet haben, ihre Orientierung wieder ändern. Für diese Rückkehr auf das niedrigere Zeeman-Energieniveau brauchen sie allerdings elektromagnetische Strahlung in Form der entsprechenden Larmorfrequenz, welche fluktuierenden kleinen Magnetfeldern in der Umgebung (als „Gitter“ bezeichnet) der jeweiligen Kerne entstammt. Diese Fluktuationen entstehen u. a. durch Rotations- und Translationsbewegungen anderer Kerne oder Elektronen in der Umgebung und deren orientierungsabhängigen magnetischen Momente (siehe Abschnitt 1.2.2). In den Fluktuationen ist u. a. die benötigte Larmorfrequenz enthalten. Die Rückkehr der makroskopischen Magnetisierung zur Boltzmann-Verteilung ist demnach ein stochastischer Prozess, der exponentiell verläuft und dessen Geschwindigkeit ( $1/T_1$  = Relaxationsrate  $R_1$ ) proportional zu der Intensität der Fluktuationen ist [18]. Die relative Fluktuationsintensität kann durch eine sog. spektrale Dichte berechnet werden (ausführlich beschrieben in [19,20]). Die spektrale Dichte gibt an, welche Leistung durch ein Signal auf eine bestimmte Frequenz (infinitesimal kleines Frequenzband) entfällt. Das Integral über das gesamte Frequenzband, das vom Signal überstrichen wird, gibt somit die Gesamtleistung des Signals wieder:

$$f(\omega, \tau_c) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (\text{Gl. 1.1})$$

Die Funktion  $f(\omega, \tau_c)$  ist eine Lorentzfunktion und ordnet jeder Frequenz  $\omega$  (also auch der Larmorfrequenz) eine relative Häufigkeit bzw. Intensität in dem „Gitter“ (der Umgebung der Protonen) zu und wird durch eine Korrelationszeit  $\tau_c$  charakterisiert. Der Kehrwert der Korrelationszeit  $\tau_c^{-1}$  ist ein Maß für die Frequenz der Magnetfeldfluktuationen in dem „Gitter“. Ist  $\tau_c$  bekannt, kann für jede Frequenz  $\omega$  eine relative Häufigkeit im „Gitter“ berechnet werden. Eine für die Kontrastmittelentwicklung entscheidende Eigenschaft einer Lorentzfunktion ist, dass ihr Integral (also die Gesamtheit der spektralen Dichte über die Frequenzachse) unabhängig von  $\tau_c$  immer gleich ist. Der Wert von  $\tau_c$  bestimmt lediglich die Form der Kurve. Ein großer Wert führt zu einer hohen spektralen Dichte bei niedrigen

Frequenzen und einem steilen Abfall zu höheren Frequenzen hin. Ein niedriger Wert von  $\tau_c$  verursacht ein geringeres Maximum der Lorentzkurve, führt aber zu einer gleichmäßigeren Verteilung der spektralen Dichte (Abb 1.2). Somit werden insbesondere auch bei höheren Frequenzen, wie den Larmorfrequenzen von Protonen bei hohen klinischen Feldstärken, höhere spektrale Dichten erreicht (siehe Abschnitt 1.2.2). Bei der Entwicklung eines  $T_1$ -Kontrastmittels für die MRT ist demnach zu beachten, bei welcher Feldstärke bzw. welchem engen Feldstärkenbereich das Kontrastmittel eingesetzt werden soll. Die Korrelationszeit  $\tau_c$  sollte dann speziell für diese Feldstärke optimiert werden, um eine möglichst effiziente spektrale Dichte bei der entsprechenden Protonenlarmorfrequenz und damit eine effiziente  $T_1$ -Relaxation zu erhalten.



**Abb. 1.2:** Lorentzfunktion für zwei unterschiedliche  $\tau_c$ -Werte. **A:** lineare Frequenzachse, **B:** logarithmische Frequenzachse über einen größeren Frequenzbereich. Die logarithmische Darstellung wird standardmäßig in der Kontrastmittelliteratur verwendet (siehe Abschnitt 1.2.2). Es ist erkennbar, dass mit zunehmender Frequenz  $\omega$  kürzere  $\tau_c$ -Werte vorteilhaft für das Erreichen einer hohen spektralen Dichte und damit für eine kurze  $T_1$ -Relaxationszeit eines Protons oder Elektrons sind. Modifiziert nach [20].

Faktoren, die die Korrelationszeit  $\tau_c$  bestimmen und beeinflussen, werden in Abschnitt 1.2.2 für den Fall der Anwesenheit paramagnetischer Ionen vorgestellt.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Lorentzfunktion ist ihr Wendepunkt, der erreicht wird, wenn das Produkt  $|\omega|\tau_c$  gleich Eins ist. Aufgrund der  $\omega^2$ -Abhängigkeit der spektralen Dichte im Nenner strebt die Funktion schnell gegen Null, sobald die Frequenz  $\omega$  (die wiederum von der verwendeten Feldstärke  $B_0$  abhängig ist) einen Wert von  $\tau_c^{-1}$  überschreitet und  $|\omega|\tau_c$  größer Eins wird. In der Kontrastmittelliteratur wird dieses Verhalten als Frequenzdispersion bezeichnet. Die Beeinflussung von  $\tau_c$  ist also eine zentrale „Stellschraube“ für die Beeinflussung der  $T_1$ -Relaxationszeit durch ein Kontrastmittel bei verschiedenen Feldstärken.

Zusammenfassend ist die  $T_1$ -Relaxationszeit eines Protons und analog dazu auch eines Elektrons oder Mehrelektronensystems wie  $Gd^{3+}$  abhängig von der spektralen Dichte des „Gitters“ bei der jeweiligen Larmorfrequenz der Spezies. Daher wird die  $T_1$ -Zeit auch als Spin-Gitter-Relaxationszeit bezeichnet. Die Mechanismen der  $T_2$ -Relaxationszeit wurden hier vernachlässigt und werden im Verlauf dieser Arbeit auch nicht thematisiert, da sie für die Anwendung Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel eine untergeordnete Rolle spielen.

### **1.2.2 Mechanismen der Beschleunigung der $T_1$ -Relaxationsrate $R_1$ von Wasserstoffkernen durch die Anwesenheit Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel**

Sind in einer wässrigen Lösung paramagnetische Ionen wie Gadolinium(III) enthalten, so tragen sie zu dem „Gitter“ für die  $T_1$ -Relaxation der Protonen von Wassermolekülen bei. Der Nettoeffekt eines  $Gd^{3+}$ -basierten Kontrastmittels (KM) wird dabei durch die Differenz  $\Delta R_1$  vor und nach Zugabe des Kontrastmittels quantifiziert. Normalisiert auf eine Kontrastmittelkonzentration [KM] von 1 mM ergibt sich die sog. Relaxivität  $r_1$  entsprechend  $r_1 = \frac{\Delta R_1}{[KM]}$  [21].

Die Relaxivität erlaubt somit eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Kontrastmitteln. Das gegenüber Protonen deutlich größere magnetische Moment der sieben ungepaarten Elektronen des  $Gd^{3+}$  ist eine effiziente Quelle fluktuierender kleiner Magnetfelder für die Protonen von Wassermolekülen. Es gibt bei den klinisch relevanten Magnetfeldstärken grundsätzlich zwei Arten, über welche die Magnetfeldfluktuationen des  $Gd^{3+}$  auf die Protonen gebundener Wassermoleküle übertragen werden. Einmal eine Interaktion zwischen dem magnetischen Moment des  $Gd^{3+}$   $\vec{\mu}_S$  und dem eines Protons eines gebundenen Wassermoleküls  $\vec{\mu}_I$  über den Raum als Dipol-Dipol-Interaktion [22] sowie eine skalare bzw. Kontaktinteraktion über Bindungen [23]. Aufgrund der Tatsache, dass erstens die Koordination zwischen Wassermolekülen und  $Gd^{3+}$  ionisch und nicht kovalent ist sowie zweitens die Wasserstoffkerne über zwei Bindungen vom  $Gd^{3+}$  entfernt sind, ist die Kontaktinteraktion jedoch sehr ineffizient und vernachlässigbar [21]. Der Effekt des  $Gd^{3+}$  über den Raum wirkt am stärksten auf die ein bis zwei Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Ions und steht im Fokus bei der Entwicklung neuer Kontrastmittel. Diese Wassermoleküle befinden sich in ständigem Austausch mit anderen Wassermolekülen der Umgebung, sodass das Kontrastmittel eine Art katalytischen Effekt ausübt [24]. Über Wasserstoffbrücken an das Kontrastmittel gebundene (zweite Koordinationssphäre) sowie in der Nähe diffundierende Wassermoleküle (äußere Koordinationssphäre) werden jedoch auch zu einem geringeren Anteil durch das  $Gd^{3+}$  beeinflusst und tragen zu  $r_1$  bei [21].

Bei der Dipol-Dipol-Interaktion entstammen die fluktuierenden Magnetfelder ausgehend von  $\text{Gd}^{3+}$  drei Mechanismen [20]. Der erste beruht auf der Elektronenspinrelaxation von  $\text{Gd}^{3+}$ , welche aufgrund effizienterer Relaxationsmechanismen deutlich schneller verläuft als die Protonenrelaxation. Der Hauptmechanismus der Elektronenrelaxation beruht auf Kollisionen von Wassermolekülen mit dem Kontrastmittel sowie Vibrationen innerhalb des Ligandenfeldes. Relaxierende Elektronenspins führen aufgrund ihres hohen magnetischen Momentes zu einer starken Magnetfeldfluktuation. Der zweite Mechanismus der Protonenrelaxation beruht auf einer Rotation des  $\text{Gd}^{3+}$ -Komplexes. Das magnetische Moment  $\vec{\mu}_s$  eines Elektrons oder Mehrelektronensystems wie  $\text{Gd}^{3+}$  ist abhängig von der Orientierung des Kontrastmittels im Raum, da das Ligandenfeld den Gesamtbahndrehimpuls  $\vec{L}$  des  $\text{Gd}^{3+}$  ungleichmäßig (nicht kugelsymmetrisch) beeinflusst. Daher entstehen durch Rotation des Kontrastmittels ebenfalls Magnetfeldfluktuationen. Der dritte Mechanismus ist die Diffusion der Wassermoleküle zu und weg von der Koordinationsstelle für Wassermoleküle am Kontrastmittel, da das Magnetfeld von  $\text{Gd}^{3+}$  *per se* nicht homogen ist.

Allen drei Fluktuationsmechanismen kann eine eigene Korrelationszeit  $\tau$  (bzw. Frequenz über  $\tau^{-1}$ ) zugeordnet werden, wobei  $\tau_s$  die Elektronenspinrelaxation,  $\tau_r$  den Rotations- und  $\tau_m$  den Diffusionsmechanismus (bezogen auf die erste Koordinationssphäre) beschreibt. Anschaulich betrachtet charakterisiert die Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  die Rotationsgeschwindigkeit des Kontrastmittels und ist proportional zu dem Molekulargewicht des Letzteren. Die Korrelationszeit  $\tau_m$  kann anschaulich als Lebenszeit eines Wassermoleküls in der ersten Koordinationssphäre verstanden werden. Der zweiten sowie der äußeren Koordinationssphäre werden in Bezug auf den Diffusionsmechanismus eigene (kürzere) Korrelationszeiten zugeordnet, wobei meist nur die zweite Koordinationssphäre bei der Entwicklung neuer Kontrastmittel noch berücksichtigt wird (Korrelationszeit:  $\tau_m'$ ).

Über die Summe der Frequenzen der drei Mechanismen kann die Gesamtfrequenz  $\tau_c^{-1}$  der Dipol-Dipol-Interaktion (hier am Beispiel der inneren Koordinationssphäre) entsprechend

$$\tau_c^{-1} = \tau_s^{-1} + \tau_r^{-1} + \tau_m^{-1} \quad (\text{Gl. 1.2})$$

erhalten werden, wobei die Gesamtkorrelationszeit  $\tau_c$  die spektrale Dichte der  $\text{Gd}^{3+}$ -basierten Magnetfeldfluktuationen charakterisiert. Die jeweils kürzeste der drei Korrelationszeiten (höchste Frequenz) dominiert dabei  $\tau_c$  (Details dazu siehe Abschnitt 1.2.3).

### 1.2.3 Quantifizierung des Relaxationseffektes Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel

Eine Quantifizierung der Relaxationsrate von Wasserstoffkernen bedingt durch die Dipol-Dipol Interaktion mit dem magnetischen Moment freier Elektronen wurde erstmals 1955 durch I. Solomon beschrieben [22]. Eine Verallgemeinerung der nach ihm benannten Solomon-Gleichung für paramagnetische Ionen mit der Gesamtspinquantenzahl  $S > \frac{1}{2}$  sowie die Berücksichtigung von Ligandenfeld-Effekten [25–27] führte zu der bis heute weitestgehend verwendeten Form zur Beschreibung des Einflusses von  $T_1$ -Kontrastmitteln auf die  $T_1$ -Relaxationszeit von Protonen:

$$\frac{1}{T_{1m}} = R_{1m} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[ \frac{7\tau_c}{1 + (\omega_S^2 \tau_c^2)} + \frac{3\tau_c}{1 + (\omega_I^2 \tau_c^2)} \right] \quad (\text{Gl. 1.3})$$

Dabei entspricht  $1/T_{1m}$  bzw.  $R_{1m}$  in diesem Falle der Relaxationsrate von Protonen eines Wassermoleküls in der ersten Koordinationssphäre eines  $T_1$ -Kontrastmittels. Dieser Bezug auf Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Kontrastmittels wird wie auch bei  $\tau_m$  über den Index „m“ hergestellt. Dies bedeutet aber wohlgermerkt nicht, dass  $R_{1m}$  nur von dem Diffusionsmechanismus beeinflusst wird. Alle drei Fluktuationsmechanismen der Gleichung 1.2 beeinflussen die Korrelationszeit  $\tau_c$  der Solomon-Gleichung. Für die Beschreibung der Quantifizierung des Relaxationseffektes des  $\text{Gd}^{3+}$  wird hier zunächst nur der Effekt auf die innere Koordinationssphäre betrachtet.

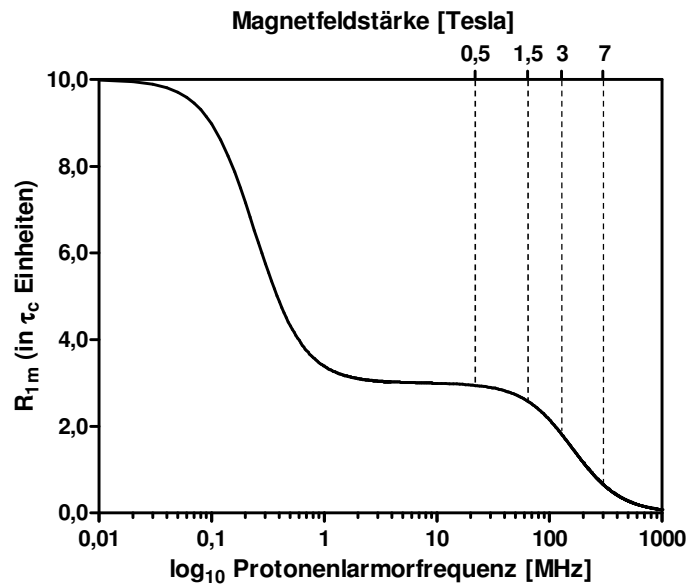
Die Solomon-Gleichung enthält grob gesehen zwei Proportionalitäten für  $R_{1m}$ . Erstens die mittlere quadrierte dipolare Interaktionsenergie  $\langle (E^{\text{dip}})^2 \rangle$  zwischen den beiden magnetischen Dipolen eines Protons (Bestandteil eines koordinierenden Wassermoleküls) und des  $\text{Gd}^{3+}$ . Die dipolare Interaktionsenergie wiederum wird in der klassischen Physik als  $E^{\text{dip}} \sim -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{|\vec{\mu}_I| |\vec{\mu}_S|}{|\vec{r}|^3}$  beschrieben, mit  $\mu_0$  als der magnetischen Permeabilität des Vakuums und  $|\vec{r}|$  als der Distanz zwischen den magnetischen Momenten des Protons  $\vec{\mu}_I$  und des  $\text{Gd}^{3+}$   $\vec{\mu}_S$  [20]. Dabei ist  $|\vec{\mu}_S| = g_e \mu_B \sqrt{S(S+1)}$  mit  $\mu_B$  als dem Bohrschen Magneton, welches das elementare magnetische Moment eines Elektrons ist [18]. Der sog. g-Faktor  $g_e$  ist ein dimensionsloser Proportionalitätsfaktor zwischen der Intensität des Spindrehimpulses  $|\vec{J}_S| = \hbar \sqrt{S(S+1)}$  der freien Elektronen von  $\text{Gd}^{3+}$  und  $|\vec{\mu}_S|$  ( $\hbar$ : Plancksches Wirkungsquantum geteilt durch  $2\pi$ ). Der Spindrehimpuls wird durch die Gesamt-Spinquantenzahl  $S$  charakterisiert, welche der Summe der Spinquantenzahlen  $s = \frac{1}{2}$  aller ungepaarten Elektronen des  $\text{Gd}^{3+}$  entspricht ( $S = 7 \times \frac{1}{2} = 7/2$ ) ([28] S. 97). Der Beitrag von  $|\vec{\mu}_I|$  wird in der Solomon-Gleichung mit Hilfe des gyromagnetischen Verhältnisses eines Protons  $\gamma_I = \frac{g_I \mu_N}{\hbar}$



repräsentiert ( $g_I$ : g-Faktor für Protonen,  $\mu_N$ : Kernmagneton). Streng genommen müsste in der Gleichung statt  $S$  die Gesamt-Drehimpulsquantenzahl  $J$  für Lanthanoide wie  $Gd^{3+}$  benutzt werden [20]. In der Regel wird allerdings nur die Approximation mit Hilfe von  $S$  verwendet, da dies auszureichen scheint um experimentelle Resultate zu beschreiben [21]. Die zweite Proportionalität für  $R_{1m}$  bilden zwei spektrale Dichteterme, wobei der erste abhängig von der Larmorfrequenz  $\omega_S$  des magnetischen Momentes von  $Gd^{3+}$  ist und der zweite von der Protonenlarmorfrequenz  $\omega_I$ . Da beide Larmorfrequenzen abhängig von der Magnetfeldstärke  $B_0$  sind, beschreibt die Solomon-Gleichung demnach auch die Abhängigkeit der Relaxationsrate  $R_{1m}$  von der Magnetfeldstärke  $B_0$ . Diese Auftragung wird als NMRD-Profil bezeichnet (NMRD = *Nuclear Magnetic Resonance Dispersion*) [7].

Der Betrag des Distanzvektors  $|\vec{r}|$  zwischen  $Gd^{3+}$  und einem Proton eines Wassermoleküls in der ersten Koordinationssphäre liegt unabhängig von der Zusammensetzung des Ligandenfeldes bei  $3,1 \pm 0,1 \text{ \AA}$  [29,30]. Daher bestehen mit Ausnahme der beiden spektralen Dichteterme sämtliche anderen Terme der Solomon-Gleichung ausschließlich aus invariablen Konstanten. Die Form des NMRD-Profiles ist daher nur von der Korrelationszeit  $\tau_c$  abhängig, welche in Abschnitt 1.2.1 bereits als zentrale „Stellschraube“ für die Beeinflussung der  $T_1$ -Relaxationszeit von Protonen durch ein  $T_1$ -Kontrastmittel beschrieben wurde. Unter der hypothetischen Annahme, dass  $\tau_c$  unabhängig von der Feldstärke ist, beschreibt die Solomon-Gleichung bei der Auftragung von  $R_{1m}$  gegen die Protonenlarmorfrequenz einen Graphen mit zwei nacheinander dispergierenden Abschnitten, welche den beiden spektralen Dichtetermen entsprechen (Abb. 1.3). Der erste Abschnitt mit einem Abfall von  $R_{1m}$  auf ~30 % des Ausgangswertes wird durch die  $\omega_S$ -Dispersion des magnetischen Momentes von  $Gd^{3+}$  verursacht. Der Abfall auf 30 % resultiert daraus, dass  $R_{1m}$  zu 70 % von diesem spektralen Dichteterm bestimmt wird ( $7\tau_c$ ). Die Zuordnung des ersten dispergierenden Terms zu der  $\omega_S$ -Dispersion resultiert ebenso aus der Tatsache, dass das gyromagnetische Verhältnis eines Elektronenspins  $\gamma_S$  (bzw. hier des Gesamtelektronenspins der ungepaarten Elektronen von  $Gd^{3+}$ ) analog zu den magnetischen Momenten 658,21 mal größer ist, als das von Protonen ( $\gamma_I$ ). Aufgrund der Beziehung  $\omega = \gamma B_0$  erreicht der  $7\tau_c$ -Term daher bei deutlich kleineren Feldstärken den Wendepunkt  $|\omega|\tau_c = 1$  und ist bei Feldstärken bis etwa 10 MHz (~0,24 Tesla) nahezu komplett dispergiert [21]. Für klinisch relevante Feldstärken ab 0,5 Tesla kann dieser Term daher vernachlässigt werden, wodurch sich die Solomon-Gleichung vereinfacht. Der  $3\tau_c$ -Term wird auch im Gegensatz zu dem  $7\tau_c$ -Term neben  $\tau_r$  und  $\tau_m$  nur von der longitudinalen Relaxationszeit  $\tau_{s1}$  (auch  $T_{1e}$  genannt) des  $Gd^{3+}$  und nicht von

dessen transversaler Relaxationszeit beeinflusst. Daher kann für klinisch relevante Feldstärken die Korrelationszeit  $\tau_c$  in Gleichung 1.2 durch  $\tau_{s1}$  ersetzt werden.

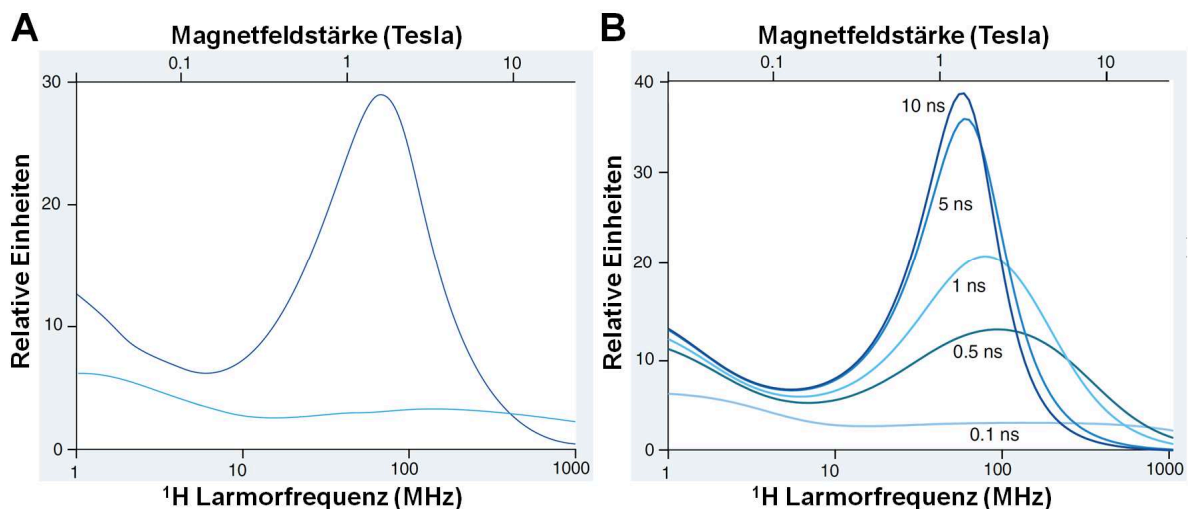


**Abb. 1.3:** Simulation der Solomon-Gleichung in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke und unter der hypothetischen Annahme einer von der Magnetfeldstärke unabhängigen Korrelationszeit  $\tau_c$  (hier  $\tau_c = 1$  ns). Es wurden für die Simulation nur die spektralen Dichteterme berücksichtigt. Die Konstanten vor der eckigen Klammer in Gleichung 1.3 wurden vernachlässigt, wodurch  $R_{1m}$  in relativen Einheiten von  $\tau_c$  angegeben ist. Die komplette Dispersion des  $7\tau_c$ -Terms bis etwa 10 MHz führt zu einem Abfall der Kurve mit einem Plateau bei 30 % des Ausgangswertes, was dem noch nicht dispergierten  $3\tau_c$ -Term entspricht. Abbildung modifiziert nach [20].

Die hypothetische Annahme, dass  $\tau_c$  unabhängig von der Feldstärke  $B_0$  ist, trifft in der Realität nicht zu. Bei verhältnismäßig kleinen Feldstärken wird  $\tau_c$  und damit der  $3\tau_c$ -Term neben  $\tau_r$  und  $\tau_m$  v. a. von der longitudinalen Elektronenspinrelaxationszeit  $\tau_{s1}$  des  $Gd^{3+}$  beeinflusst, die bei etwa  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  s liegt [31–34]. Die longitudinale Relaxation eines Elektronenspins ist jedoch analog zu einem Kernspin auch von Magnetfeldfluktuationen abhängig, nur dass letztere eben auf anderen Mechanismen beruhen (siehe Abschnitt 1.2.3). Diese Fluktuationen werden ebenfalls durch eine von der Feldstärke  $B_0$  abhängige spektrale Dichte charakterisiert. N. Bloembergen und L.O. Morgen beschrieben 1961 u. a. eine der Solomon-Gleichung analoge Gleichung für die Feldstärken-abhängige longitudinale Elektronenrelaxationszeit  $\tau_{s1}$  [35]. Mit Hilfe dieser Gleichung kann wiederum die Feldstärkenabhängigkeit der Korrelationszeit  $\tau_c$  des  $3\tau_c$ -Terms der Solomon-Gleichung beschrieben werden. Zusammen werden diese Gleichungen als Solomon-Bloembergen-Morgen (SBM)-Gleichungen bezeichnet. Die SBM-Theorie ist die bislang gültige Theorie, um die Abhängigkeit der Relaxationsrate  $R_{1m}$  von der Feldstärke  $B_0$  zu beschreiben.

Die Tatsache, dass auch die longitudinale Elektronenspinrelaxation einen dispergierenden Term enthält, führt dazu, dass  $\tau_{s1}$  mit zunehmender Feldstärke länger bzw. die

Elektronenspinrelaxation ineffizienter wird. Dadurch wird die Korrelationszeit  $\tau_c$  der Solomon-Gleichung und damit  $R_{1m}$  bei höheren Feldstärken ( $\geq 1,5$  Tesla) nur noch von der Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  des Kontrastmittels und der Lebenszeit  $\tau_m$  der Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre bestimmt. Die mit  $B_0$  länger werdende  $\tau_{s1}$ -Zeit hat aber noch einen weiteren wichtigen Effekt. Sie führt zu einer stetigen Verlängerung der Korrelationszeit  $\tau_c$  (siehe Gleichung 1.2) und damit zu einem Anstieg des  $3\tau_c$ -Terms in dem NMRD-Profil. Der Anstieg hält bis kurz nach Erreichen des Wendepunktes  $|\omega|\tau_c = 1$  an, nach welchem der  $3\tau_c$ -Term dispergiert (Abb. 1.3A). Das Maximum im Verlauf des NMRD-Profiles liegt dabei abhängig von  $\tau_r$  und  $\tau_m$  zwischen 0,5 und 2 Tesla [13]. Die Form des NMRD-Profiles wird in diesem Bereich v. a. durch die Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  des Kontrastmittels moduliert [20]. Da der  $3\tau_c$ -Term einer Lorentzfunktion entspricht (siehe Abb. 1.2), führt ein großer Wert für  $\tau_r$  ( $Gd^{3+}$  an ein Makromolekül gebunden) zu sehr hohen Maxima des NMRD-Profiles im Bereich von 0,5-1,0 Tesla, aber ist eher ineffizient bei Feldstärken  $> 3$  Tesla (Abb. 1.3B). Diese Modulation der Relaxationseffizienz eines Kontrastmittels über  $\tau_r$  ist eine der häufigsten Methoden zur Entwicklung neuer Kontrastmittel für einen bestimmten Feldstärkenbereich (siehe Abschnitt 1.3).



**Abb. 1.3:** Simulation des Effektes der Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  eines  $T_1$ -Kontrastmittels auf die Form des  $^1H$ -NMRD-Profiles. Die Feldstärkenabhängigkeit der Elektronenrelaxation von  $Gd^{3+}$  und damit von  $\tau_c$  der Solomon-Gleichung wurde mit Hilfe der entsprechenden Bloembergen-Morgen-Gleichung simuliert.  $\tau_m = 20$  ns für alle Simulationen. „Relative Einheiten“ kann sich auf  $R_{1m}$  oder auch die Relaxivität  $r_1$  (siehe Text) beziehen. **A:** Vergleich von  $^1H$ -NMRD-Profilen in Anwesenheit eines kleinmolekularen  $Gd^{3+}$ -Komplexes mit  $\tau_r = 100$  ps (hellblau) sowie eines größeren, langsam rotierenden Komplexes mit  $\tau_r = 2$  ns (dunkelblau). **B:** Verlauf von  $^1H$ -NMRD-Profilen mit unterschiedlichen Werten für  $\tau_r$ . Geringere  $\tau_r$ -Werte führen zu höheren  $R_{1m}$ - bzw.  $r_1$ -Werten bei sehr hohen Feldstärken. Abbildung modifiziert nach [13].

Für die Quantifizierung der Relaxivität  $r_1$ , bezogen auf Wassermoleküle in der **inneren** Koordinationssphäre, reichen die SBM-Gleichungen alleine und damit die Beschreibung von  $R_{1m}$  nicht aus. Da die Solomon-Gleichung auf einer Dipol-Dipol-Interaktion beruht, die mit

einer Proportionalität von  $1/r^6$  einhergeht, haben Distanzen  $> 3,1 \text{ \AA}$  zwischen  $\text{Gd}^{3+}$  und den Protonen große Auswirkungen auf die gemessene Relaxationsrate  $R_{1m}$ . Daher hat die Austauschrate der Wassermoleküle  $\tau_m^{-1}$  eine Sonderstellung und geht neben dem Effekt auf  $\tau_c^{-1}$  (Gleichung 1.2) ein zweites Mal als direkte Proportionalität in die Bestimmung von  $r_1$  ein (Gleichung 1.4). Desweiteren ist  $r_1$  noch von der Anzahl koordinierender Wassermoleküle abhängig, was in der Solomon-Gleichung nicht berücksichtigt wird. Letzterer Effekt wird in Form der an das Kontrastmittel gebundenen Wasserfraktion  $P_m = \frac{q[\text{KM}]}{[\text{H}_2\text{O}]} = \frac{q[\text{KM}]}{55600 \text{ mM}}$  ausgedrückt mit  $q$  als der Anzahl gebundener Wassermoleküle und  $[\text{KM}]$  als der Kontrastmittelkonzentration in mM. Insgesamt ergibt sich  $r_1$  somit anhand folgender Gleichung [36,37] als

$$r_1 = \frac{\Delta R_1}{[\text{KM}]} = \frac{P_m}{(T_{1m} + \tau_m) / [\text{KM}]} = \frac{q[\text{KM}] / [\text{H}_2\text{O}]}{(T_{1m} + \tau_m) / [\text{KM}]} = \frac{q / [\text{H}_2\text{O}]}{(T_{1m} + \tau_m)} \quad (\text{Gl. 1.4})$$

mit  $\Delta R_1$  als der Differenz der gemessenen Relaxationsraten vor und nach Zugabe des Kontrastmittels und  $1/T_{1m} = R_{1m}$ . Die Magnetfeldabhängigkeit von  $r_1$  wird dabei nur von  $1/T_{1m}$  bestimmt, da sowohl  $q$  als auch  $\tau_m$  unabhängig von der Feldstärke sind. Die Auftragung von  $r_1$  gegen die Feldstärke  $B_0$  wird daher ebenfalls als NMRD-Profil bezeichnet und ist charakteristisch für jedes Kontrastmittel.

Wird die Relaxivität  $r_1$  in Abhängigkeit von  $B_0$  experimentell gemessen, kann Gleichung 1.3 mittels nichtlinearer Regression in das gemessene Profil eingepasst und Parameter wie  $\tau_m$ ,  $\tau_r$ ,  $\tau_s$  und  $q$  geschätzt werden [21]. Dabei wird mit Effekten des Kontrastmittels auf Wassermoleküle in der zweiten und äußeren Koordinationssphäre, die zu  $r_1$  beitragen können, folgendermaßen verfahren. Der Beitrag der äußeren Koordinationssphäre wird als unabhängig von der Art des Kontrastmittels auf etwa  $2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  geschätzt [38]. Dieser Wert wird vor einer nichtlinearen Regression von dem gesamten NMRD-Profil subtrahiert [39]. Für den Beitrag von Wassermolekülen in der zweiten Koordinationssphäre zu  $r_1$  (in der Theorie auch auf die äußere Koordinationssphäre anwendbar) gelten grundsätzlich aufgrund der Dipol-Dipol-Interaktion mit  $\text{Gd}^{3+}$  ebenso die SBM-Gleichungen wie für die erste Koordinationssphäre, nur mit anderen Werten für die Distanz  $|\vec{r}|$  der Wassermoleküle zu  $\text{Gd}^{3+}$  und einer eigenen Lebenszeit  $\tau_m'$  in dieser Koordinationssphäre. Der quantitative Beitrag der zweiten Koordinationssphäre ist allerdings in der Regel schwer abzuschätzen, da die genaue Distanz der entsprechenden Wassermoleküle zu  $\text{Gd}^{3+}$  nicht bekannt ist. Es wird daher meist nur auf die reine Anwesenheit eines entsprechenden Effektes geschlossen, wenn mehrere Parameter wie  $\tau_r$ ,  $\tau_m$  (bei niedrigen Feldstärken auch  $\tau_s$ ) unabhängig von einem NMRD-Profil bestimmt wurden. Reichen diese Parameter nicht aus, um die

gemessenen  $r_1$ -Werte des NMRD-Profiles zu beschreiben, wird auf Wassermoleküle in der zweiten Koordinationssphäre geschlossen [39].

## 1.3 Ansätze zur Verbesserung Gadolinium(III)-basierter Kontrastmittel

### 1.3.1 Theorie

Bisher klinisch zugelassene kleinmolekulare Kontrastmittel wie Magnevist<sup>®</sup> oder Dotarem<sup>®</sup> erhöhen in der Regel entweder unspezifisch den Kontrast in allen Geweben, die zugänglich für das entsprechende Molekül sind, oder sie sind spezifisch für einen ganzen Gewebetyp wie bspw. die Leber [40]. Ein wichtiger und bereits seit mehreren Jahrzehnten verfolgter Ansatz zur Erhöhung der Sensitivität in der Tumordiagnostik mit Hilfe der MRT ist daher die Zielführung des Kontrastmittels hin zu Tumorzellen (*Targeting*) [7]. Für ein spezifisches *Targeting* ist es allerdings nötig, Zelloberflächenmoleküle o. ä. als Zielstrukturen zu wählen, die von Tumorzellen überexprimiert werden. Da solche Moleküle selbst nach Überexpression nur in nano- bis niedrigen mikromolaren Konzentrationen vorliegen, ist es ebenso nötig die Sensitivität eines Kontrastmittels selbst zu erhöhen [14]. Dafür wurde in den meisten Fällen bisher mindestens eine der beiden folgenden Strategien verwendet [24]. Die erste dieser Möglichkeiten besteht in der Kopplung mehrerer (dutzender bis tausender) kleinmolekularer Chelatoren (*Assembly*), um eine hohe lokale Konzentration an  $Gd^{3+}$  zu erreichen. Die zweite Möglichkeit besteht in einer Parameteroptimierung zur Verbesserung der Relaxivität  $r_1$  des Kontrastmittels. Letztere liegt für kleinmolekulare Chelatoren aufgrund der geringen Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  meist bei etwa  $4-8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  über dem Großteil des relevanten Feldstärkenbereichs [41]. Für eine Parameteroptimierung kommen den Gleichungen 1.3 und 1.4 entsprechend die Parameter  $q$ ,  $\tau_m$  und  $\tau_r$  in Frage. Eine Verdopplung der koordinierenden Wassermoleküle  $q$  führt dabei direkt zu einer Verdopplung der Relaxivität, hat aber den Nachteil, dass die Stabilität des Komplexes verringert wird [21]. Daher können stabile Komplexe nur mit maximal  $q = 2$  synthetisiert werden [24]. Eine Verkürzung des  $\tau_m$ -Wertes bzw. eine Erhöhung der Wasseraustauschrate  $\tau_m^{-1}$  kann ebenfalls eine Steigerung von  $r_1$  bewirken, jedoch nur bis zu einem gewissen Grad. Wird  $\tau_m$  zu kurz, kann der relaxierende Effekt des  $Gd^{3+}$  nicht mehr ausreichend auf das Wassermolekül übertragen werden und  $R_{1m}$  wird geringer. Es gibt demnach einen optimalen Bereich für  $\tau_m$ , der abhängig von der verwendeten Feldstärke  $B_0$  ist [13,42] und bei kleinmolekularen Chelatoren über unterschiedliche koordinierende Gruppen moduliert werden kann [43,44]. Eine in der Praxis ebenfalls sehr häufige Anwendung ist die Anpassung der

Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  an den zu verwendenden Feldstärkenbereich zur Erhöhung von  $R_{1m}$  und damit auch von  $r_1$  (siehe Abschnitt 1.2.3). Eine möglichst starre Kopplung des  $Gd^{3+}$  bzw. eines Chelators an ein Makromolekül kann dadurch bei Feldstärken bis zu 1,5 Tesla eine mehr als zehnfache Steigerung von  $r_1$  bewirken [42].

### 1.3.2 Praktische Umsetzungen in der Literatur

Die Zielführung eines Kontrastmittels hin zu biologischen Strukturen wie Tumorzellen wird in der Literatur häufig mit dem *Assembly*-Ansatz verbunden, d.h. eine große Menge der Kontrastmittelmoleküle wird an die Zielstruktur gebunden. Für die Zielführung wurden dabei v. a. Affinitätsliganden eines Rezeptors wie Folat oder Östrogen [45–49], Zielstruktur bindende Peptide [50–54], Antikörper [55–58] und Proteine (in Form sog. *Affibodies*) [59,60] verwendet. Der *Assembly*-Ansatz wurde entweder in Form diskreter Chelator-Multimere [61,62] oder höher molekularer Nanopartikel umgesetzt. Letztere können eine mittlere Größe zwischen 10 und mehr als 1000 nm haben [63] und dienen als Gerüst für eine kovalente oder nicht-kovalente Kopplung kleinmolekularer Chelatoren. Sie werden in „weiche“, „mittel-harte“ und „harte“ Nanopartikel klassifiziert [64]. Die Klasse der „weichen“ Nanopartikel besteht aus Liposomen [65–69], Mizellen [70–73], Lipidemulsionen [74] und linearen Polymeren [75–77]. Verzweigte Polymere und sog. Dendrimere gehören zu der „mittel-harten“ Klasse [78–82]. Kohlenstoff basierte Nanoröhren (*Carbon Nanotubes*) [83–85] und Goldnanopartikel [86–89] sind Beispiele aus der „harten“ Klasse. Abgesehen von Nanopartikeln wurden z. T. auch Proteine wie Apoferritin, virale Kapside, Hitzeschock- und neu entworfene Proteine als Gerüst für eine kovalente Kopplung kleinmolekularer Chelatoren verwendet [90–94].

Zu einem gewissen Grad trägt der *Assembly*-Ansatz aufgrund der Steigerung des Molekulargewichtes des Kontrastmittels auch zu einer Optimierung von  $\tau_r$  für Feldstärken bis 1,5 Tesla bei. Häufig behalten multimerisierte oder an Nanopartikel bzw. Proteine gekoppelte Chelatoren jedoch eine hohe interne Flexibilität [42]. Dieser Effekt ist von Vorteil bei Feldstärken größer als 3 Tesla. Ein  $Gd^{3+}$ -basiertes Kontrastmittel kann jedoch gerade bei Feldstärken bis 1,5 Tesla hohe Relaxivitäten und damit hohe Sensitivitäten erreichen. Dafür ist bei diesen Feldstärken allerdings ein hoher  $\tau_r$ -Wert, also ein möglichst hohes Molekulargewicht des Kontrastmittels mit langsamer Rotation, nötig. Eine möglichst geringe Flexibilität des Vektors zwischen  $Gd^{3+}$  und entsprechenden Wasserprotonen in der inneren Koordinationssphäre ist daher wünschenswert. Auf Basis kleinmolekularer Chelatoren wurde in dieser Richtung bereits ein Fortschritt erzielt [95,96], der aber von dem erreichbaren Optimum noch deutlich entfernt ist.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

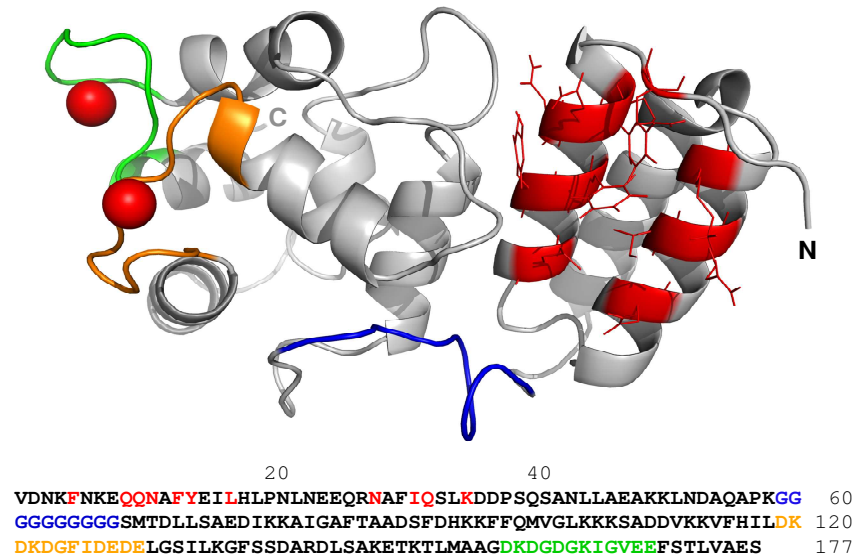
Ein Großteil bisher entwickelter tumorspezifischer  $T_1$ -Kontrastmittel weist aufgrund zu hoher interner Flexibilität eine geringe Relaxivität auf. Dies wird meist mittels des *Assembly*-Ansatzes durch eine hohe Zahl verknüpfter Kontrastmittelmoleküle kompensiert. Dieser Ansatz hat jedoch insbesondere im Falle von Nanopartikeln zwei Nachteile. Erstens ist bei relativ großen Partikeln deren Austritt aus der Blutbahn in umliegendes (Tumor-)Gewebe und damit die Bindung an Tumorzellen limitiert. Zweitens müssen Nanopartikel aufgrund ihrer Größe in der Leber abgebaut werden, was zu einer inkompletten Ausscheidung des toxischen  $Gd^{3+}$  führen kann [44]. Daher sollte im Rahmen des BMBF-Projektes und innerhalb dieser Arbeit u. a. ein bisher wenig untersuchter Ansatz der direkten Bindung des  $Gd^{3+}$  an ein Protein neben bereits bestehenden Publikationen auf diesem Feld weiter evaluiert werden. Ein solcher Ansatz würde der Theorie nach die Flexibilität des Ions deutlich einschränken. Aufgrund des deutlich größeren Molekulargewichtes eines Proteins im Vergleich zu einem Chelator könnten insbesondere bei Feldstärken bis 1,5 Tesla hohe Relaxivitäten erzeugt werden. Dadurch könnte evtl. eine Verknüpfung weniger  $Gd^{3+}$ -Ionen bereits eine ausreichende Sensitivität erzeugen und ein sehr großes Molekulargewicht des Kontrastmittels, wie es bei Nanopartikeln der Fall ist, vermieden werden. Eine hohe Relaxivität, bedingt durch die Bindung des  $Gd^{3+}$  an ein Protein, konnte bereits beispielhaft an dem sog. Protein CA1.CD2 gezeigt werden [97]. Dieser Ansatz sollte hier nun mit einem weiteren Protein untersucht werden, um zu entscheiden, ob eine Optimierung der kinetischen Stabilität eines solchen Komplexes lohnend und möglich ist. Das Projekt fand dabei in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen statt. Dort wurde für die Bindung von  $Gd^{3+}$  in einem ersten Ansatz die hochaffine  $Ca^{2+}$  bindende S55D/E59D-Mutante des  $\alpha$ -Parvalbumins aus der Ratte gewählt (pdb-ID: 1S3P [98]). Dieses EF-Hand-Protein beinhaltet zwei  $Ca^{2+}$ -Bindestellen: die CD- (*Loop* zwischen C- und D-Helix) und die EF-Bindestelle (*Loop* zwischen E- und F-Helix). Aufgrund der ähnlichen Ionenradien von  $Gd^{3+}$  und  $Ca^{2+}$  (100 bzw. 106 pm bei siebenfacher Koordinierung in dem Protein [99]) sollte Letzteres für die Anwendung als  $T_1$ -Kontrastmittel durch  $Gd^{3+}$  ersetzt werden. Das Molekulargewicht des Parvalbumins von 12 kDa müsste dabei eine Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  zwischen 1 und 10 ns erzeugen. An Serumalbumin (~67 kDa) bindende Kontrastmittel haben zum Vergleich nach der Bindung an HSA  $\tau_r$ -Werte von etwa 10 ns [24] und erzeugen hohe Relaxivitäten von etwa  $40 \text{ mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  zwischen 0,2 und 0,47 Tesla [39]. Es wurde zum Zeitpunkt des Entwerfens des Kontrastmittels davon ausgegangen, dass das Parvalbumin mit einem etwas geringeren Molekulargewicht somit einen guten  $\tau_r$ -Wert für den

Feldstärkenbereich zwischen 0,47 und 1,5 Tesla liefern sollte (siehe Abschnitt 1.2.3). Auch das CA1.CD2-Protein lieferte bei einem ähnlichen Molekulargewicht wie das Parvalbumin  $r_1$ -Werte von  $117 \text{ mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  bei 1,5 Tesla.

Für die Zielführung zu Tumorzellen war in dem BMBF-Projekt eine Modularität in Bezug auf die Bindung des Kontrastmittels an verschiedene Zielstrukturen vorgesehen. Hier wurde ein Ansatz gewählt, bei dem die Z-Domäne, eine Doppel-Punktmutante der B-Domäne des Proteins A aus dem Organismus *Staphylococcus aureus* [100], als zweite Domäne des proteinbasierten Kontrastmittels fungieren sollte. Die Z-Domäne ist in der Lage, selektiv an die konstante Region ( $F_c$ -Teil) humaner Antikörper, und z. T. auch solcher von anderen Säugetieren, zu binden. Verschiedene, gegen Tumorzellen gerichtete therapeutische IgG-Antikörper könnten somit potentiell verwendet werden, um das Kontrastmittel zu den jeweiligen Zielstrukturen zu führen. Dieser Ansatz hätte den Vorteil, dass das Kontrastmittel schnell für die Detektion unterschiedlicher Tumorarten oder auch anderer Zielstrukturen verwendet werden könnte, ohne vorher den Antikörper mit Hilfe eines Affinitäts-*Tags* zu modifizieren. Ein ähnlicher Ansatz mit Inkorporation der Z-Domäne in die Hülle von Nanopartikeln wurde 2011 nach Beginn dieses Projektes von einer japanischen Gruppe publiziert, wobei dieser Ansatz eher für einen *in vitro* Einsatz zur Detektion von Antikörpern auf Mikrochips dienen soll [101].

Ein IgG-Antikörper hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 140-150 kDa und würde nach Bindung des Kontrastmittels dessen  $\tau_r$ -Wert deutlich vergrößern. Die maximal erreichbare Relaxivität  $r_1$  bei einem Feldstärkenbereich von etwa 1,5 Tesla würde dadurch verringert werden, da sich das Maximum des entsprechenden NMRD-Profils zu weit zu noch kleineren Feldstärken verschieben würde (siehe Abb. 1.3B). Aus diesem Grund wurde bei dem Design des Kontrastmittels durch den Lehrstuhl für Bioinformatik ein flexibler *Linker* aus zehn Glycinen (Dekaglycin-*Linker*) verwendet, um die Z-Domäne (N-terminal) von der Parvalbumin-Domäne zu trennen. Weiterhin sollte der lange *Linker* auch die korrekte und unabhängige Faltung beider Domänen gewährleisten. Das entsprechende Kontrastmittel (Abb. 1.4) hat den Namen Zarvin erhalten. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Zarvin biochemisch und biophysikalisch zu charakterisieren. Schwerpunkte dabei waren das Überprüfen der korrekten Faltung beider Domänen sowie deren Funktionalität. Die erzielten Ergebnisse werden anschließend genutzt, um sowohl die potentielle Einsetzbarkeit der direkten Bindung des  $\text{Gd}^{3+}$  an ein Protein als auch die Nutzung der Z-Domäne für eine Zielführung zu diskutieren.





**Abb. 1.4:** Schnappschuss einer in der Moleküldynamik simulierten Struktur von Zarvin (Moleküldynamik-Simulation durchgeführt von Stefan Franke am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen) sowie dessen Aminosäuresequenz. In der sich N-terminal befindenden Z-Domäne (pdb-ID: 1Q2N) sind die Aminosäurereste rot hervorgehoben, die an der Bindung an den F<sub>c</sub>-Teil eines Antikörpers beteiligt sind [102,103]. Der flexible Dekaglycin-Linker (blau) trennt die Z- von der S55D/E59D α-Parvalbumin-Domäne (pdb-ID: 1S3P). Letztere komplexiert über die Loops zwischen der C- und D-Helix (CD-Bindestelle, orange) sowie der E- und F-Helix (EF-Bindestelle, grün) physiologisch zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen (rote Kugeln). Die Ca<sup>2+</sup>-Ionen sollen bei der Funktion von Zarvin als Kontrastmittel durch zwei Gd<sup>3+</sup>-Ionen ersetzt werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle hier nicht separat aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) oder Merck (Darmstadt) in für die jeweilige Anwendung angemessenem Reinheitsgrad bezogen.

Chemikalie	Hersteller
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
Atto465-NHS-Ester	ATTO-TEC, Siegen
Atto488-NHS-Ester	ATTO-TEC, Siegen
Atto594-Maleimid	ATTO-TEC, Siegen
Bis[sulfosuccinimidyl] suberat (BS <sup>3</sup> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Deuteriumoxid (99,9 %)	Sigma-Aldrich, Seelze
2',5'-Dihydroxyacetophenon	Sigma-Aldrich, Seelze
Hellmanex® II	Hellma Analytics, Müllheim
1,5-IAEDANS-Iodacetamid	Life technologies, Darmstadt
Sulfosuccinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido) hexanoat (Sulfo-LC-SDA)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
3-(Trimethylsilyl)propionat-D4 (Na-Salz)	Merck, Darmstadt

### 2.2 Puffer und Lösungen für Standardmethoden

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Anodenpuffer für die Gelelektrophorese mit Schägger-Jagow-Gelen	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9
10 % APS für das Gießen von Schägger-Jagow-Gelen	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) 90 % Aqua bidest
Coomassie-Färbe-Lösung	1,25 g Coomassie Brillant Blau G250 227 ml Ethanol 46 ml Essigsäure ad 227 ml Aqua bidest
DNA-Probenpuffer (6×)	40 % (w/v) Saccharose 0,5 % Orange G Aqua bidest
2 % Hellmanex® II für die Küvettenreinigung	10 ml Hellmanex® II 490 ml Aqua bidest

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS-Puffer (10×)	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4 ad 1 l Aqua bidest
4× Protein-Probenpuffer für Schägger-Jagow-Gele (10 ml)	4 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 4,8 ml 86 % Glycerin 1,6 g SDS 4 mg Coomassie Brilliant Blue G250 ad 10 ml Aqua bidest 5 mM DTT vor Benutzung hinzu
6 % Sammelgel zum Gießen von Schägger-Jagow-Gelen (5 ml)	1 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 1,25 ml Gel-Puffer (0,75 M Tris) 2,72 ml Aqua bidest 25 µl 10 % APS-Lösung 10 µl TEMED
10 % <i>Spacer</i> -Gel zum Gießen von Schägger-Jagow-Gelen (5 ml)	1,66 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 1,75 ml Gel-Puffer (1 M Tris) 1,56 ml Aqua bidest 25 µl 10 % APS-Lösung 10 µl TEMED
50× TAE-Puffer für die DNA- Gelelektrophorese	2,42 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l Aqua bidest
12,5 % Trenngel zum Gießen von Schägger-Jagow-Gelen (10 ml)	4,2 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 3,5 ml Gel-Puffer (1 M Tris) 1,66 ml 86 % Glycerin (14 %) 0,58 ml Aqua bidest 50 µl 10 % APS-Lösung 10 µl TEMED
50×TS2 (1 l)	700 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 300 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$ 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 900 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

## 2.3 Nährmedien für die Bakterienanzucht

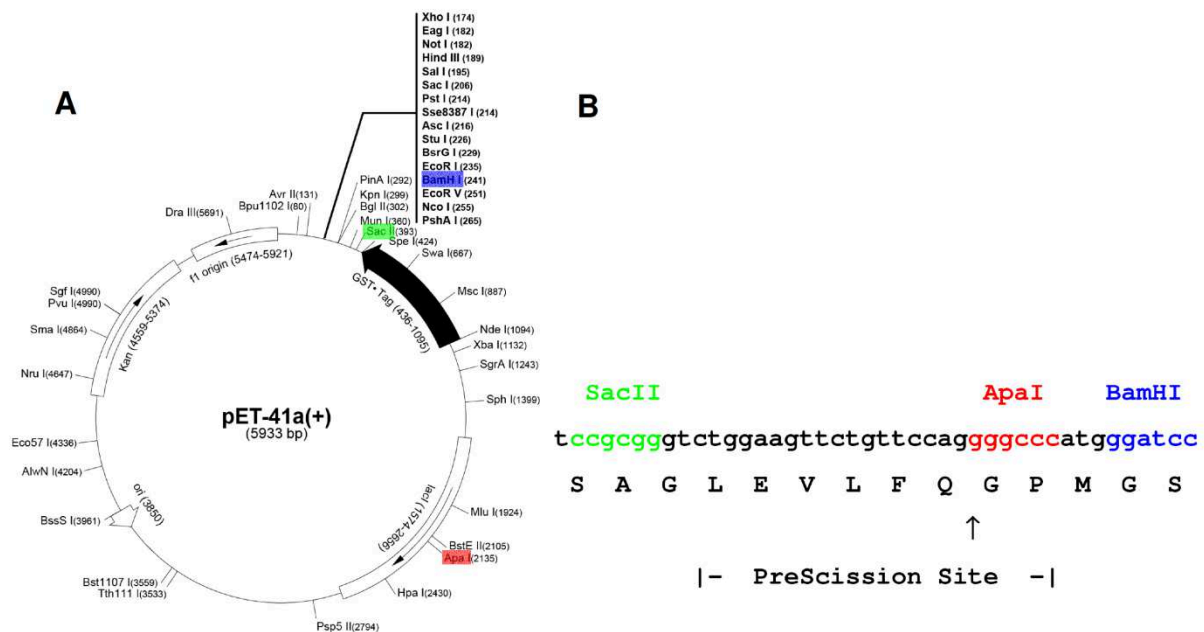
Medium	Zusammensetzung
LB	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7 eingestellt ad 1 l Aqua bidest
LB-Agarose	15 g Agarose ad 1 l LB-Medium
2×YT	16 g Bacto-Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7 eingestellt ad 1 l Aqua bidest
SOC	20 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 ml 1M KCl pH 7 eingestellt Autoklavieren 20 ml 1M Glucose (steril) 10 ml 1M MgCl <sub>2</sub> (steril) ad 1 l Aqua bidest

Die Nährmedien wurden nach dem Autoklavieren mit 30-50 mg/l des Antibiotikums Kanamycin versetzt. Dieses wurde als Stocklösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml in Aqua bidest hergestellt und bei -20 °C gelagert. Das Antibiotikum diente zur Selektion von Bakterienzellen, welche das Plasmid auf Basis des pET41\_Pre-Vektors enthielten (siehe Abschnitt 2.5).

## 2.4 Bakterienstämme und humane Zelllinien

Stamm bzw. Zelllinie / Verwendung	Genotyp	Hersteller / Referenz
<i>E. coli</i> shox cells / Lagerungsstamm für Plasmide	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 ara Δ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL(StrR) nupG λ-	Bioline, Luckenwalde
<i>E. coli</i> BL21(DE3)T1r / Expressionsstamm	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm λ(DE3) tonA	Sigma-Aldrich (Seelze)
A431 / Humane Tumorzelllinie mit Überexpression des EGF-Rezeptors		[104]; Erhalten von Michaela Arndt, Universitätsklinikum Heidelberg

## 2.5 Verwendetes Plasmid



**Abb. 2.1:** A: Darstellung der Vektorkarte des pET41a-Vektors (Merck, Darmstadt), welcher durch Einführen einer Erkennungssequenz für die PreScission-Protease (B) über die Schnittstellen SacII und BamHI der *Multiple Cloning Site* (MCS) sowie durch Deletion der ApaI-Schnittstelle im *lacI*-Gen zu dem Vektor pET41\_Pre modifiziert wurde [105].

Die Nukleotidsequenzen aller im Rahmen dieser Arbeit zu exprimierenden Proteine wurden über die Schnittstellen ApaI und BamHI in den pET41\_Pre-Vektor kloniert. Die entsprechenden Modifizierungen des Vektors wurden institutsintern im Jahre 2006 von Daniel Neumann durchgeführt [105]. Der Vektor beinhaltet ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin. Die Selektion von Bakterienzellen, welche dieses Plasmid besitzen, wurde daher mit Hilfe von Kanamycin durchgeführt. Das Vorhandensein eines *lac*-Operons ermöglicht über die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Induktion der entsprechenden Translation eines Fusionsproteins bestehend aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und dem Protein der über die Schnittstellen ApaI und BamHI eingeführten Nukleotidsequenz. Das GST befindet sich dabei N-terminal gefolgt von einem His<sub>6</sub>-Tag, der Erkennungssequenz für die PreScission-Protease sowie C-terminal dem zu reinigenden Protein.

## 2.6 Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
<i>Fast Digest</i> Apal	Restriktionsendonuklease	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Fast Digest</i> BamHI	Restriktionsendonuklease	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase, 150 U/μl	Ligation	Metabion, Martinsried
Lysozym aus Hühnereiweiß	Zellwandlyse von Bakterien	Sigma-Aldrich, Seelze
Pfu-DNA-Polymerase, 5 U/μl	PCR	Metabion, Martinsried
PreScission-Protease	Schneiden einer Peptidkette an der Erkennungssequenz der Protease	Institutsinterne Herstellung
DreamTaq DNA-Polymerase, 5 U/μl	PCR	Metabion, Martinsried

## 2.7 Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
<i>Nucleo Spin® Plasmid</i>	Plasmidpräparation (Mini)	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleo Bond® Xtra Midi</i>	Plasmidpräparation (Midi)	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleo Spin® Gel and PCR clean up</i>	DNA-Reinigung	Macherey-Nagel, Düren
<i>Quik-Change®</i>	Einführen von Punktmutationen	Agilent technologies, Waldbronn

## 2.8 Weitere Verbrauchsmaterialien

Materialtyp	Ausführung	Hersteller
DNA-Marker	mi-100 bp+	Metabion, Martinsried
dNTPs (2,5 mM)		Metabion, Martinsried
dNTPs (10 mM)		Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
<i>Fast Digest</i> -Puffer (10×)		Fermentas, St. Leon-Rot
Filter	Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, 0,22 μm Porengröße	Carl Roth, Karlsruhe
	Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, 0,45 μm Porengröße	Carl Roth, Karlsruhe
	Express™ Plus 0,22 μm	Millipore, Schwalbach
<i>Gravity Flow</i> Säulen	PD-10	GE Healthcare, Solingen

Materialtyp	Ausführung	Hersteller
Konzentratoren (Centricons)	Amicon Ultra-15, 10000 Da MWCO	Millipore, Schwalbach
	Amicon Ultra-15, 3000 Da MWCO	Millipore, Schwalbach
	Amicon Ultra-2, 10000 Da MWCO	Millipore, Schwalbach
	Amicon Ultra-2, 3000 Da MWCO	Millipore, Schwalbach
MALDI-Standard	Protein Calibration Standard I	Bruker Daltonics, Bremen
Mikrotiterplatte	PP-Microplatte, Steril 96 well Flat Bottom	Greiner bio-one, Solingen
Zellkulturplatten für Konfokalmikroskopie	$\mu$ -Slide 8 well plates	Ibidi, Martinsried
Zellkulturplatten benutzt für MRT-Messungen	4x6 well TC-Plate	Greiner bio-one, Solingen
NMR-Röhrchen	AP5-800-7	Ampol, Warschau
PCR-Wasser		Life technologies, Darmstadt
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)		Metabion, Martinsried
Plastikküvetten	Rotilabo® Einmal-Küvetten, Halbmikro 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Protein-Marker	Mark 12™	Life technologies, Darmstadt
C18-Spitzen für die Entsalzung von Proteinen	Supel-Tips C18	Sigma-Aldrich, Seelze
Taq-Polymerase Puffer (10x)		Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA

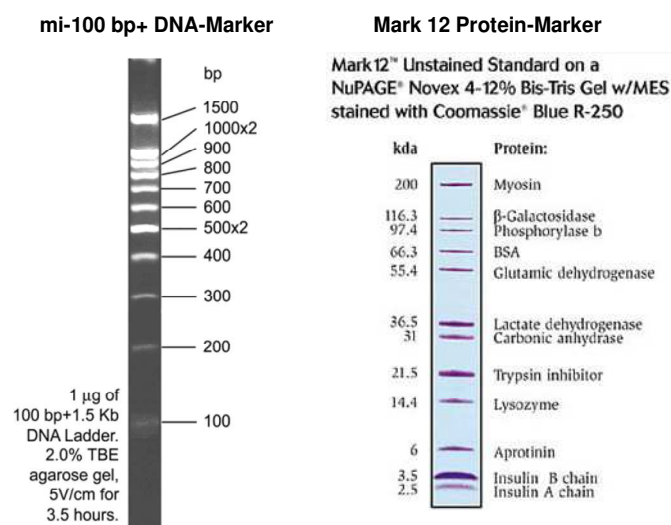


Abb. 2.2: Verwendete DNA- und Proteinmarker

## 2.9 Wiederverwertbare Materialien

Materialtyp	Ausführung	Hersteller
FPLC-Säulen	GSTrap FF 16/10, 20 ml	GE Healthcare, Solingen
	HiTrap Q HP, 5 ml	GE Healthcare, Solingen
	10/300 GL Superdex 75 pg	GE Healthcare, Solingen
	HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare, Solingen
	HiLoad 26/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare, Solingen
Küvetten	104-QS, 10 mm Schichtdicke (UV-Vis)	Hellma Analytics, Müllheim
	108.002B-QS, 10 mm Schichtdicke (UV-Vis)	Hellma Analytics, Müllheim
	108F-QS, 10×4 mm (Fluoreszenz)	Hellma Analytics, Müllheim
	105.251-QS, 3×3 mm, 15 mm Zentrumshöhe (Fluoreszenz)	Hellma Analytics, Müllheim
	110-QS, 1 mm Schichtdicke (UV-Vis/ CD)	Hellma Analytics, Müllheim
	110-QS, 2 mm Schichtdicke (UV-Vis/ CD)	Hellma Analytics, Müllheim
	2 mm-Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen
MALDI-Target-Platte	MTP 384 <i>ground steel</i>	Bruker Daltonics, Bremen

## 2.10 Geräte

Gerätetyp	Modell	Hersteller
Autoklav	H+P Varioklav 25T	Oberschleißheim
CD-Spektrometer	J-815	Jasco Analytical Instruments, USA
	J-710	Jasco Analytical Instruments, USA
Elektroporator	<i>MicroPulser</i> <sup>TM</sup>	BioRad, Berkeley, USA
Fluoreszenzspektrometer	Cary <i>Eclipse</i> mit temperierbarem <i>Multicell Holder</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
FPLC-Anlagen	<i>DuoFlow</i> mit QuadTec UV-Vis Detektor und BioFrac Fraktions-sammler	Biorad, Berkeley, USA
	Äkta FPLC P920 mit UPC-900 Detektor und Frac-920 Fraktionssammler	GE Healthcare, Solingen
Gelkammer (DNA)	<i>Mini Subcell</i> GT	BioRad, Berkeley, USA
Gelkammer (PAGE)	XCell Mini <i>Protean</i> 3	BioRad, Berkeley, USA
Heizblock	LS1	VLM, Bielefeld
Inkubatoren	BD53	Binder, USA
	HT Minitron	Infors, Bottmingen
	HT	Infors, Bottmingen
	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Konfokalmikroskop	TCS SP5	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim
Magnetrührgerät	MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach
	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach



Gerätetyp	Modell	Hersteller
MALDI-Massenspektrometer	autoflex <i>speed</i>	Bruker Daltonik, Bremen
MRT-Geräte	Magnetom Aera	Siemens Healthcare, Erlangen
	Magnetom Skyra	Siemens Healthcare, Erlangen
	Magnetom 7T	Siemens Healthcare, Erlangen
NMR-Spektrometer	Ultrashield™ 700 mit Tripleresonanz Cryoprobekopf	Bruker BioSpin, Fällanden
pH-Meter	<i>SevenEasy</i>	Mettler-Toledo, Gießen
	Elektrode: InLab® Routine pro pH	
	766 Calimatic; Mikroelektrode: <i>ScienceLine</i> N6003	Knick, Berlin; Schott Instruments Analytics, Mainz
PCR-Gerät	<i>Thermocycler</i> T3000	Biometra, Göttingen
Reinstwasseranlage	MilliQ Biocel	Millipore, Schwalbach
Spannungsgeber	<i>PowerPac basic</i>	BioRad, Berkeley, USA
	<i>Power Pack</i> P25T	Biometra, Göttingen
Sterilbank	HERA <i>safe</i>	Thermo Scientific, Langenselbold
Tischphotometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
	<i>NanoDrop</i> ND 1000	Peqlab, Erlangen
UV-Lampe 100 W	UVIS / 131100	Desaga GmbH, Heidelberg
UV-Tisch	BioDoc <i>Analyze</i> Ti5	Biometra, Göttingen
	UV-Flächenstrahler N36-M	Benda, USA
UV-Vis-Spektrometer	Cary 100	Agilent Technologies, Waldbronn
Vakuumpumpe	KNF-LAB	KNF, Freiburg
Waagen	EG	Kern, Balingen-Frommern
	ABJ (Feinwaage)	Kern, Balingen-Frommern
Zellaufschlussanlagen	Microfluidizer M-110L	Microfluidics, Newton, USA
	SONOPULS	Bandelin, Hamburg
Zentrifugen	Avanti JE mit JLA 9.1000 Rotor	Beckman coulter, Krefeld
	Optima LE-80K Ultrazentrifuge mit Ti45 Rotor	Beckman coulter, Krefeld
	Tisch-Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Tisch-Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Tischzentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg

## 2.11 Software

Software	Verwendung	Referenz
AUREMOL	Quantifizierung von 2D-NMR-Signalen	Bruker, Rheinstetten; [106]
CcpNmr Analysis	Visualisierung und Bearbeitung von 2D-NMR-Spektren	[107]
ClustalW2	<i>Alignment</i> von Proteinsequenzen	[108]
Flex Control	Aufnahme und Auswertung von MALDI-Massenspektren	Bruker Daltonics, Bremen
GraphPad Prism 5.04	Lineare und nichtlineare Regressionen, Darstellung von Graphen	[109]
Image J 1.46r	Visualisierung und Bearbeitung von Mikroskopie-Bildern	[110]
OligoCalc	Berechnung der Eigenschaften von <i>Primern</i>	[111]
PyMOL 1.2r1	Visualisierung von Proteinstrukturen	[112]
Protparam	Berechnung von Proteineigenschaften basierend auf deren Primärstruktur	[113]
syngo fastView	Visualisierung und Auswertung von MRT-Bildern	Siemens Healthcare, Erlangen
Topspin 2.1	Aufnahme und Prozessierung von NMR-Spektren	Bruker Biospin, Fällanden

## 2.12 Klonierungen

Die Nukleotidsequenzen aller im Rahmen dieser Arbeit zu exprimierenden Proteine wurden über die Schnittstellen *Apal* und *BamHI* in den pET41\_Pre-Vektor (siehe Abschnitt 2.5) kloniert. Die Nukleotidsequenz des *in silico* entworfenen Proteins Zarvin wurde von der Firma Geneart (Regensburg) synthetisiert und in den pET41\_Pre-Vektor subkloniert. Die Nukleotidsequenzen der separaten Z- und Parvalbumin-Domäne (S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin der Ratte) wurden basierend auf diesem Plasmid mittels PCR amplifiziert und ebenfalls in den Vektor pET41\_Pre kloniert. Dafür wurden folgende *Primer* (synthetisiert bei Metabion, Martinsried), welche ebenfalls die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme enthielten, benutzt:

### Z-Domäne:

*Forward* ApaI: 5'-CACACAGGGCCCGTGGATAACAAATTTAACAAGAACAGC-3'  
*Reverse* komplementär BamHI: 5'-GGTTGGGGATCCATTATTTTCGGCGCCTGCGCATCGT-3'

### Parvalbumin-Domäne:

*Forward* ApaI: 5'-CACACAGGGCCCAGCATGACCGATCTGCTGAGCGC-3'  
*Reverse* komplementär BamHI: 5'-GGTTGGGGATCCATTAGCTTTCGCCACCAGGG-3'

Für die Amplifizierung mittels PCR wurde in beiden Fällen folgender Ansatz verwendet:

Komponente	Menge
DNA (Zarvin-Plasmid)	0,1 µl 450 ng/µl (=> 45 ng)
<i>Forward-Primer</i>	2 µl 10 µM
<i>Reverse-Primer</i>	2 µl 10 µM
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
Pfu-Polymerase-Puffer (10×)	5 µl
Pfu-Polymerase	1 µl
PCR-Wasser	35,9 µl
	50 µl gesamt

Folgende PCR-Programme wurden zur Amplifizierung für die beiden Ansätze verwendet:

### Z-Domäne:

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
95	4 min	1
95	1 min	5 (-3 °C pro Zyklus)
60	50 s	
72	1 min	
95	1 min	5 (+3 °C pro Zyklus)
51	50 s	
72	1 min	
95	1 min	30
64	50 s	
72	1 min	
8	∞	

Parvalbumin-Domäne:

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
95	4 min	1
95	1 min	5 (-3 °C pro Zyklus)
61	50 s	
72	1 min	
95	1 min	5 (+3 °C pro Zyklus)
55	50 s	
72	1 min	
95	1 min	30
63	50 s	
72	1 min	
8	∞	

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden nach der PCR mit Hilfe eines *Nucleo Spin® Gel and PCR clean up* Kits (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt und in 30 µl PCR-Wasser eluiert. Ein ebenfalls mit Hilfe des Kits aufgereinigter Kontrollansatz wurde als *blank*-Probe zur photometrischen Quantifizierung der PCR-Fragmente an einem *NanoDrop* ND 1000 verwendet. Beide Fragmente hatten eine Konzentration von etwa 100 ng/µl. Mit Hilfe dieser gereinigten PCR-Fragmente wurden anschließend folgende Restriktionsansätze für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert:

Komponente	Z- bzw. Parvalbumin-Domäne	pET41 Pre-Vektor
PCR-Fragment	15 µl (=> ~1500 ng)	1,1 µl 0,91 µg/µl (=> ~1000 ng)
<i>Fast digest</i> Apal	1 µl	1 µl
<i>Fast digest</i> BamHI	1 µl	1 µl
<i>Fast digest</i> Puffer (10×)	5 µl	5 µl
PCR-Wasser	28 µl	41,9 µl
	50 µl gesamt	50 µl gesamt

Die mit Hilfe der beiden Restriktionsenzyme geschnittenen PCR-Fragmente sowie der pET41\_Pre-Vektor wurden auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen, um die herausgeschnittenen Nukleotide zu entfernen. Die anschließend aus dem Gel aufgereinigten DNA-Fragmente sowie der linearisierte Vektor wurden erneut photometrisch quantifiziert (*blank*-Probe: Aufreinigung einer Bande des Agarosegels ohne DNA-Fragment). Das geschnittene Fragment der Z-Domäne hatte eine Konzentration von 30,2 ng/µl, das Fragment der Parvalbumin-Domäne 29,9 ng/µl und der linearisierte Vektor 7,7 ng/µl. Folgende Ligationsansätze wurden daraufhin für eine Stunde bei 16 °C inkubiert mit anschließender achtminütiger Hitzeinaktivierung bei 65 °C:

Z-Domäne:

Komponente	Menge
Vektor	7 µl (54 ng)
Fragment	0,2 µl (6 ng)
Ligase-Puffer (10×)	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
PCR-Wasser	9,8 µl
20 µl gesamt	

Parvalbumin-Domäne (2 Ansätze):

Komponente	Menge
Vektor	7 µl (54 ng) bzw. 5 µl (38,5 ng)
Fragment	0,2 µl (6 ng) bzw. 0,5 µl (15 ng)
Ligase-Puffer (10×)	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
PCR-Wasser	9,8 µl bzw. 11,5 µl
20 µl gesamt	

Jeweils 1 µl eines Ligationsansatzes wurde anschließend mittels Elektroporation in elektrisch kompetente *E. coli shoxx cells* transformiert. Dafür wurden die Zellen mit der hinzugegebenen DNA zunächst drei Minuten auf Eis inkubiert und danach mit der entsprechenden Einstellung für Bakterien des Gerätes elektroporiert. Die so behandelten Zellen wurden anschließend mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Je zweimal 250 µl von jedem Ansatz wurden anschließend auf einer LB-Agarplatte (Kanamycin enthalten) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Auswahl der am nächsten Tag sichtbaren Kolonien wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf das Enthalten des entsprechenden Fragmentes der Z- bzw. der Parvalbumin-Domäne überprüft. Dafür wurde jeweils eine Kolonie mit einer Pipettenspitze z. T. aufgenommen und mit einem der folgenden Ansätze (als Master-Mix pipettiert, hier Einzelansätze dargestellt) gemischt:

Komponente	Menge
Forward-Primer	1 µl
Reverse-Primer	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Taq-Polymerase-Puffer (10×)	2,5 µl
Pfu-Polymerase	0,5 µl
PCR-Wasser	19 µl
25 µl gesamt	

Die DNA einer Auswahl positiv auf das jeweilige Z-Domänen- bzw. Parvalbumin-DNA-Fragment getesteter Klone (siehe Abb. 3.2) wurde anschließend mittels einer Übernachtskultur in LB-Medium vervielfältigt (37 °C, 180 rpm) und mit Hilfe eines *Nucleo Spin® Plasmid Kits* (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Die Sequenzierung der in den pET41\_Pre-Vektor klonierten DNA-Fragmente wurde von der Firma GATC biotech (Konstanz) durchgeführt (siehe Anhang A).

Dauerkulturen der *shoxx cell* Konstrukte mit den Plasmiden, welche die Nukleotidsequenz des Zarvins bzw. der Z- und Parvalbumin-Domäne enthielten, wurden durch Mischen von 600 µl einer Übernachtskultur mit 400 µl sterilem 86 %igem Glycerin hergestellt. Diese Kulturen wurden schockgefroren und bei –85 °C gelagert.

### 2.13 Einführen von Punktmutationen

Das Einführen von Punktmutationen in das Zarvin-DNA-Konstrukt zur Herstellung einer S146C- sowie einer D72C-Mutante des Zarvins wurde mit Hilfe Zarvin-Plasmides (pET41\_Pre-Vektor), eines Quik-Change® Kits (Agilent technologies, Waldbronn) sowie folgender *Primer* durchgeführt:

#### S146C-Mutante:

*Forward:* 5'-CGTGATCTG **TGT** GCGAAAGAAACC-3'

*Reverse komplementär:* 5'-GGTTTCTTTTCGC **ACA** CAGATCACG-3'

#### D72C-Mutante:

*Forward:* 5'-GGCAGCATGACC **TGT** CTGCTGAGC-3'

*Reverse komplementär:* 5'-GCTCAGCAG **ACA** GGTCATGCTGCC-3'

Das durch die *Primer* mutierte Codon ist hervorgehoben.

### 2.14 Expression des GST-Zarvin sowie der entsprechenden Z- und Parvalbumin-Domänen Konstrukte

Die auf dem pET41\_Pre-Vektor basierenden Plasmide, welche die DNA-Sequenz des Zarvins oder eines positiven Z-Domänen- bzw. Parvalbumin-Domänen-Klones enthielten, wurden mit Hilfe einer chemischen Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)T1r transformiert. Dafür wurden entsprechend chemisch kompetente Zellen dieses Stammes mit 1 µl DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für zwei Minuten wurden die Zellen mit 200 µl LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm

inkubiert. Ein solcher Ansatz wurde entweder direkt zur Herstellung einer Übernachtskultur (in LB-Medium) verwendet oder zwischen 50 und 100 µl des Ansatzes wurden auf einer LB-Platte (mit Kanamycin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Übernachtskulturen für die Expression aller GST-Fusionsproteine wurden in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin hergestellt. Die regulären Expressionen wurden in 2×YT-Medium mit 35-50 mg/l Kanamycin durchgeführt, wobei in der Regel 4 l dieses Mediums mit 10 ml Übernachtskultur pro Liter Medium angeimpft und bei 37 °C sowie 180 rpm inkubiert wurden. Nach Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) zwischen 0,6 und 0,7 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins mit 0,2 mM IPTG induziert. Die Expressionsdauer betrug bei allen Konstrukten zwischen drei und fünf Stunden bei 29 °C.

Expressionen zur Herstellung von  $^{15}\text{N}$ -markierten GST-Fusionsproteinen für die NMR-Spektroskopie wurden in M9-Minimalmedium versetzt mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid durchgeführt. Dafür wurden zunächst bis zu zwei Liter LB-Medium mit jeweils 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C sowie 180 rpm bis zu einem  $OD_{600}$ -Wert von 0,7 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert, mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die so erhaltenen Bakterienpellets wurden dann in M9-Minimalmedium (mit 30 mg/l Kanamycin) resuspendiert (ein Pellet von 1 l LB-Medium pro 1 l M9-Medium) und bei 37 °C sowie 180 rpm bis zu einem  $OD_{600}$ -Wert von 0,8 wachsen gelassen. Die Expression wurde mit 0,2 mM IPTG induziert und für das GST-Zarvin sowie das GST-Parvalbumin über einen Zeitraum von fünf Stunden bei 30 °C und 180 rpm durchgeführt. Die Expressionszeit der Z-Domäne betrug hier etwa 15 Stunden.

Nach den Expressionen wurden die Bakterienzellen bei 4 °C und 6300×g für 20 min abzentrifugiert und in 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4 (Niedrigsalzpuffer) resuspendiert. Die resuspendierten Pellets wurden schockgefroren und bis zur Reinigung des GST-Fusionsproteins bei -20 °C gelagert.

### **2.15 Reinigung des Zarvins sowie der Z- und Parvalbumin-Domäne**

Die resuspendierten und gefrorenen Pellets der exprimierten GST-Fusionsproteine wurden zügig in einem Wasserbad aufgetaut und mit 1 mM des Serinprotease-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt. Desweiteren wurde eine Spatelspitze Lysozym aus dem Hühnereiweiß in dem Niedrigsalzpuffer gelöst und zu dem Pellet gegeben. Diese Suspension wurde für eine Stunde bei 4 °C mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit Hilfe eines *Microfluidizers* oder einem

Ultraschallpuls-Gerät (5 Pulse für 20-30 s bei 60 % Intensität) aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden daraufhin durch 70-90 min Ultrazentrifugation bei 4 °C und 142000×g pelletiert. Der lösliche Überstand wurde mit einem Spritzenfilters (45 µm) von noch vorhandenen Schwebstoffen befreit. Mit Hilfe einer Biorad *DuoFlow*-FPLC-Anlage (BioRad, Berkeley, USA) wurde das gelöste GST-Fusionsprotein an eine GSTrap FF 20 ml Säule gebunden. Die restliche auf der Säule verbleibende Suspension wurde mit dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 (Basispuffer) von der Säule gewaschen. Unspezifisch an die Säule gebundene Proteine wurden im Weiteren durch das Waschen mit mehreren Säulenvolumina des Hochsalz-Puffers 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4 zum Großteil entfernt. Im Falle der Reinigung von Zarvin oder der Parvalbumin-Domäne (S55D/E59D α-Parvalbumin der Ratte) wurde potentiell aus *E. coli* an das Protein gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  durch zwei Waschschriffe mit dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 70 mM EDTA, pH 7,4 entfernt. Dabei wurde das Säulenbett jeweils 30 und 90 min mit dem Puffer bei dem ersten bzw. zweiten Waschschrift inkubiert. Ein weiterer Waschschrift mit dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,2 mM ATP, pH 7,4 diente dem Entfernen potentiell an das GST-Fusionsprotein gebundenen Chaperonen aus *E. coli* (HSP40 und HSP70). Das Fusionsprotein wurde mit dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM Glutathion, pH 7,4 eluiert. Die Flussraten der einzelnen Schritte betrugen zwischen 0,5 und 1,5 ml/min.

Das eluierte Protein wurde anschließend mit einem Centricon konzentriert und durch wiederholtes Konzentrieren und Verdünnen mit dem Basispuffer von dem Großteil des Glutathions befreit. Etwa 1 µl der lehrstuhlintern hergestellten PreScission-Protease wurde dann pro 6 mg GST-Fusionsprotein hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die abgeschnittene GST wurde daraufhin durch erneutes Auftragen des Ansatzes auf eine GSTrap FF Säule zum Großteil entfernt. Der Durchfluss wurde konzentriert und mit Hilfe einer Äkta-FPLC-Anlage (GE Healthcare, Solingen) oder einer Biorad *DuoFlow*-FPLC-Anlage je nach Proteinmenge auf eine HiLoad 16/600 oder HiLoad 26/600 Gelfiltrationssäule mit dem Säulenmaterial Superdex 75 (GE Healthcare, Solingen) aufgetragen. Dieser Schritt diente dem Entfernen löslicher Proteinaggregate sowie nicht von der GSTrap-Säule gebundener GST. Als Gelfiltrationspuffer wurde der oben genannte Basispuffer verwendet. Die Flussraten der Gelfiltrationsläufe betrugen zwischen 1,0 und 1,5 ml/min.

Das eluierte Protein wurde konzentriert, aliquotiert und schockgefroren. Bis zur jeweiligen Benutzung wurde das gefrorene Protein bei -20 °C aufbewahrt.

Die S146C- und die D72C-Mutante des Zarvins wurden analog zu der obigen Beschreibung gereinigt, wobei zusätzlich 1 mM DTT in allen Puffern verwendet wurde.



## 2.16 Quantifizierung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden grundsätzlich photometrisch mit Hilfe der jeweiligen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  der Proteine über das Lambert-Beer'sche Gesetz quantifiziert. Für Zarvin und dessen Cystein-Mutanten sowie für die Z-Domäne wurde dabei ein Extinktionskoeffizient von  $1490 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei 280 nm (1 Tyrosin), für das S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin ein Koeffizient von  $1512 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei 258 nm (8 Phenylalanine) und für Cetuximab ein Koeffizient von  $217315 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei 280 nm verwendet. Die Koeffizienten bei 280 nm wurden mit Hilfe des Programmes Protparam berechnet. Der Koeffizient des Parvalbumins wurde über die Summe der Koeffizienten von 8 Phenylalaninen bei 258 nm mit einem Wert von  $189 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  pro Phenylalanin [114] berechnet. Keines der verwendeten Proteine, nicht einmal der Antikörper Cetuximab, zeigte nach Aufnahme eines UV-Vis-Spektrums Absorptionswerte bei oder oberhalb von 320 nm. Eine Streulicht-Korrektur der gemessenen Konzentrationen war daher nicht notwendig.

Konzentrationen von Protein-Stocklösungen wurden an einem *NanoDrop* ND 1000 gemessen, wobei mindestens drei Absorptionsmessungen gemittelt wurden. Sehr exakt benötigte Proteinkonzentrationen für die Berechnung von Sekundärstrukturanteilen mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden mit einem Cary 100 UV-Vis-Spektrophotometer gemessen. Dabei wurde sowohl für die *blank*-Probe, als auch für die zu messende Probe eine Absorptionskinetik über mehrere Minuten gemessen und gemittelt.

## 2.17 MALDI-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrische Analyse von Proteinen wurde an einem Autoflex *speed* MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Dafür wurden die Proteine zunächst mit Hilfe von Supel-Tips C18 (Sigma-Aldrich, Seelze) entsalzt und mit einem Volumen von 2  $\mu\text{l}$  eines 50:50-Gemisches (v/v) aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) (in Wasser) eluiert. Anschließend wurde das eluierte Protein in einem Verhältnis von 1:1:1 (v/v) mit 2 % TFA (in Wasser) und Matrixlösung gemischt. Die Matrixlösung wurde hergestellt, indem 7,6 mg 2',5'-Dihydroxyacetophenon in 375  $\mu\text{l}$  analytischem Ethanol so weit wie möglich gelöst und 125  $\mu\text{l}$  einer 18 mg/ml-Lösung von Di-Ammoniumhydrogencitrat (in Wasser) hinzugefügt wurden. 0,5  $\mu\text{l}$  des 1:1:1-Gemisches wurden auf eine MTP 384 *ground steel Target*-Platte (Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen. Es wurde gewartet, bis der Tropfen bei Raumtemperatur getrocknet war (*Dried*

*droplet* Methode). Anschließend wurden die Proben auf der *Target*-Platte in dem Massenspektrometer untersucht.

## 2.18 CD-Spektroskopie

CD-spektroskopische Messungen wurden überwiegend an einem JASCO J-815 und z. T. an einem JASCO J-710 CD-Spektrometer (Jasco Analytical Instruments, USA) durchgeführt. Für die Aufnahme von CD-Spektren des Zarvins wurde das Protein in dem Puffer 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4 auf eine Endkonzentration von ca. 0,15 mg/ml verdünnt (exakte Konzentration mit Cary 100 Spektrophotometer bestimmt und in mg/ml umgerechnet) und in eine Absorptionsküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm (Hellma Analytics, Müllheim) gefüllt. Die Spektren wurden von 200-260 nm (Fern-UV-Spektrum) mit folgenden Parametern aufgenommen: *data pitch*: 0,2 nm, *scanning mode*: *continuous*, Scan-Geschwindigkeit: 100 nm/min, *response time*: 0,5 s, *bandwidth*: 2 nm, Temperatur: 20 °C. Pro Spektrum wurden 15 *Scans* gemittelt. Die Prozessierung der Spektren wurde separat für das Protein-Spektrum und das entsprechende *blank*-Spektrum des Puffers durchgeführt, indem beide Spektren so auf der y-Achse verschoben wurden, dass die Datenpunkte von 250-260 nm Null ergaben. Anschließend wurde das Pufferspektrum von dem Spektrum mit Protein subtrahiert. Danach wurde die mdeg-Einheit des Differenzspektrums mit Hilfe eines mittleren Molekulargewichtes pro Aminosäure (*mean residue weight* = MRW) von 107,091 Da für Zarvin und der so exakt wie möglich gemessenen Konzentration des Proteins (mg/ml) in die Einheit des mittleren CD-Extinktionskoeffizienten pro Aminosäure ( $\Delta\epsilon_{\text{MRW}}$ ) transformiert. Die genannten Schritte der Datenprozessierung wurden mit Hilfe unpublizierter Software (Stephen R. Martin, NIMR London) durchgeführt. Die Sekundärstrukturanteile des Zarvins wurden auf Basis eines so prozessierten Spektrums mit den einschlägigen Programmen CDSSTR [115], Selcon3 [116] und ContinLL [117] durchgeführt. Die in Tabelle 3.1 genannten Bereiche für die Sekundärstrukturanteile decken dabei den gesamten Bereich ab, der von den drei Programmen berechnet wurde.

Schmelzkurven von Zarvin und den einzelnen Domänen wurden in dem Puffer 20 mM Natriumphosphat, pH 7,4 bzw. 20 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,4 für die  $\text{Gd}^{3+}$ -gesättigten Spezies durchgeführt. Die beiden Puffer bewirkten dabei keinen nennenswerten Unterschied in den gemessenen Schmelztemperaturen der Spezies ohne  $\text{Gd}^{3+}$ , was durch das Schmelzen von Zarvin auch in dem HEPES-Puffer beispielhaft überprüft wurde. Für die Messungen wurden die Proteine mit einer Konzentration von 0,09 mg/ml in eine Absorptionsküvette mit einer Schichtdicke von 2 mm (Hellma Analytics, Müllheim) gefüllt. Folgende Parameter

wurden für die Aufnahme der Schmelzkurven verwendet: *data pitch*: 0,1 °C, *delay time*: 180 s, *bandwidth*: 1 nm, *response time*: 8 s, *temperature slope*: 0,5 °C/min für das Schmelzen und 1 °C für das Abkühlen zur Messung der Rückfaltung einer Zarvin-Probe. Die Schmelztemperaturen  $t_{1/2}$  wurden ermittelt, indem in einem Tabellenkalkulationsprogramm die erste Ableitung des CD-Signals über einen Temperaturbereich von jeweils 3 °C gleitend über die gesamte Schmelzkurve gebildet wurde. Die Schmelztemperatur (wenn sie noch innerhalb des messbaren Temperaturbereiches lag) wurde dann an dem Maximum der ersten Ableitung abgelesen.

### 2.19 NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Zarvins, des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins und der Z-Domäne wurden an einem Ultrashield™ 700 NMR-Spektrometer mit Tripleresonanz-Cryoprobekopf (Bruker Biospin, Fällanden) bei einer Protonenfrequenz von 700,22 MHz aufgenommen. Die drei Proteine wurden dafür  $^{15}\text{N}$ -markiert gereinigt (siehe Abschnitt 2.15). Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 27 °C (bzw. im Falle des Parvalbumins zusätzlich bei 15 °C) in dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt. Alle Proben enthielten für die Messungen außerdem 10 % Deuteriumoxid (v/v), welches als interner Feldfrequenz-Lock diente, sowie 1 mM 3-(Trimethylsilyl)propionat-D4 (TSP), welches bei Bedarf eine Eichung der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Signale erlaubt. Ein Spektrum des Parvalbumins wurde in Anwesenheit von 1 mM EDTA aufgenommen. Die in Abbildung 3.8 dargestellten Spektren des Parvalbumins sowie des Zarvins wurden in Anwesenheit von 17 mM  $\text{CaCl}_2$  in den Proben durchgeführt. Die Endkonzentrationen der Proteine betrugen während der Messungen etwa 500  $\mu\text{M}$  für Zarvin, etwa 280  $\mu\text{M}$  für das S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin und etwa 100  $\mu\text{M}$  für die Z-Domäne in einem Volumen von jeweils 600  $\mu\text{l}$ . Die Proben wurden dafür in ein 5 mm *Thin-Wall* NMR-Röhrchen (Ampol, Warschau) gefüllt.

Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der Proteine wurden mit dem Programm Topspin 2.1 (Bruker Biospin, Rheinstetten) aufgenommen und prozessiert. Für die Aufnahme wurde das Pulsprogramm *hsqcetf3gpsi* [118–120] der Bruker Standardbibliothek mit einem 90° Hochleistungs-Puls von 13,5  $\mu\text{s}$  verwendet. Für die Spektren in Abbildung 3.8 wurden 250 *Scans* bei einer spektralen Breite von 2838,433 Hz in der  $F_1$ - und 11261,262 Hz in der  $F_2$ -Dimension aufgenommen. Die Zahl der realen Datenpunkte betrug 256 in der  $F_1$ - und 1024 in der  $F_2$ -Dimension. Die Spektren des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins bei 15 °C sowie die Spektren ohne  $\text{CaCl}_2$  und in Anwesenheit von 1 mM EDTA wurden mit 8 *Scans* und ansonsten identischen Bedingungen aufgenommen. Diese Spektren wurden mit einem

ebenfalls aus nur 8 *Scans* bestehenden Spektrum des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins ohne EDTA und einer Temperatur von 27 °C verglichen.

Für die Prozessierung der Spektren wurde über den Befehl *xfb* eine Fourier-Transformation in beiden Dimensionen durchgeführt. Dabei wurde eine  $\pi/2$  verschobene Sinusquadratfunktion als Filterfunktion verwendet. Anschließend wurde über die Befehle *abs1* und *abs2.water* eine Basislinienkorrektur in beiden Dimensionen durchgeführt. Eine Korrektur der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Signale der Spektren in Abbildung 3.8 erwies sich als nicht notwendig, da alle Spektren unter identischen Proben- und Messbedingungen aufgenommen wurden und dementsprechend keine Verschiebungen der gesamten Spektren gegeneinander beobachtet wurden.

Die Quantifizierung der 2D-Signale in den Spektren des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins vor und nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  wurde mit Hilfe des Programmes AUREMOL (Bruker Biospin, Rheinstetten; [106]) durchgeführt. Die Überlagerung sowie die Anpassung der Konturen der Spektren in Abbildung 3.8 wurden mit dem Programm CcpNmr Analysis durchgeführt [107].

### 2.20 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationen des Zarvins und der Z-Domäne wurden an einer BioRad *DuoFlow*-FPLC-Anlage und mit Hilfe einer Superdex 75 10/300 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Solingen) bei 4 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Als Gelfiltrationspuffer wurde 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 (bei 4 °C) verwendet. Für die Kalibration der Säule wurden die Proteine  $\alpha$ -Amylase aus Schweine-Pancreas (51 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchen-Muskel (36 kDa), Chymotrypsinogen A aus Rinder-Pancreas (25,7 kDa) und Lysozym (14,4 kDa) (alle von Sigma-Aldrich, Seelze) (14,4 kDa) verwendet. Die verwendeten Mengen der einzelnen Proteine lagen im Mikrogramm-Bereich.

### 2.21 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Anionenaustausch-Chromatographie von Zarvin, dem S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin und der Z-Domäne wurde an einer BioRad *DuoFlow*-FPLC-Anlage mit Hilfe einer 5 ml Q-Sepharose-Säule (HiTrap Q HP, GE Healthcare, Solingen) bei 4 °C durchgeführt. Zum Binden der Proteine an die Säule wurden diese mit Hilfe eines 2 ml-Centricons in den Puffer 20 mM Tris, pH 8,0 (bei 4 °C) umgepuffert, welcher dann auch als Binde-/Auftragspuffer verwendet wurde. Die Chromatographien wurden alle mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Nach dem

Auftragen eines Proteins auf die Säule wurden drei Gradienten für die stetige Zunahme des Elutionspuffers 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 (bei 4 °C) verwendet:

	<b>Endanteil Puffer B (%)</b>	<b>Volumen bis Endanteil erreicht (ml)</b>
Gradient 1	6	20
Gradient 2	15	20
Gradient 3	30	80

Zwischen Gradient 1 und 2 sowie zwischen Gradient 2 und 3 wurden noch jeweils 20 ml mit 6 % bzw. 15 % Elutionspuffer konstant beibehalten bis der nächste Gradient startete.

## 2.22 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Zarvin und Cetuximab

### 2.22.1 Kopplung von Atto465-NHS an Zarvin

Etwa 5,65 mg Zarvin wurden mit Hilfe eines Centricons in den Puffer 150 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3 umgepuffert und auf etwa 160 µM (Volumen: ~750 µl) konzentriert. Ein etwa zweifacher molarer Überschuss des Farbstoffes Atto465-NHS (zum Großteil gelöst in 40 µl des Puffers und 7 µl Dimethylformamid) wurde zu dem Protein gegeben. Das Gemisch aus Protein und Farbstoff wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur und 550 rpm in einem Thermomixer inkubiert (mit Alufolie abgedunkelt). Anschließend wurde der Ansatz für zweimal 10 min bei 4 °C und etwa 16000×g abzentrifugiert. Nicht an Protein gebundener Farbstoff des Überstandes wurde mit Hilfe einer Superdex 75 10/300 GL Gelfiltrationssäule entfernt. Als Gelfiltrationspuffer diente 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4. Die Konzentration des Proteins sowie die Kopplungseffizienz des Farbstoffes wurden photometrisch mit Hilfe eines Cary 100 Spektrophotometers gemessen. Dafür wurden die Absorptionen einer Verdünnung des gereinigten Protein-Farbstoff Konjugates bei 280 nm sowie bei 453 nm (Absorptionsmaximum von Atto465) gemessen. Über den Absorptionswert bei 453 nm und den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes bei dieser Wellenlänge von 75000 M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup> wurde die Konzentration des Farbstoffes in der Lösung berechnet (~16 µM). Laut Hersteller beträgt die Absorption des Farbstoffes bei 280 nm 54 % von der Absorption bei 453 nm. Dieser Betrag wurde von dem bei 280 nm gemessenen Absorptionswert subtrahiert. Die Konzentration des Zarvins in der Lösung wurde mit Hilfe des Differenzbetrages sowie einem Extinktionskoeffizienten von 1490 M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup> berechnet (~49 µM). Die Kopplungseffizienz ergibt sich aus dem Quotienten der Konzentrationen des Farbstoffes und des Zarvins und lag in diesem Falle bei 0,32 Farbstoffmolekülen pro Zarvin-Molekül.

### 2.22.2 Kopplung von 1,5-IAEDANS-Iodacetamid an Zarvin-S146C

Etwa 1,7 mg Zarvin-S146C wurden mit Hilfe eines Centricons in PBS-Puffer, pH 7,2 umgepuffert und auf etwa 295  $\mu\text{M}$  (Volumen:  $\sim 300 \mu\text{l}$ ) einkonzentriert. Ein etwa dreifacher molarer Überschuss des Farbstoffes 1,5-IAEDANS (gelöst in 270  $\mu\text{l}$  des Puffers und 30  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid) wurde zu dem Protein gegeben. Das Gemisch aus Protein und Farbstoff wurde für eine Stunde und 15 Minuten bei Raumtemperatur und 600 rpm in einem Thermomixer inkubiert (mit Alufolie abgedunkelt). Nicht an das Protein gebundener Farbstoff wurde mit Hilfe einer PD-10-Säule entfernt. Die Konzentration von 1,5-IAEDANS wurde in der unverdünnten Lösung mit Hilfe der Absorption bei 336 nm und einem Extinktionskoeffizienten von  $5700 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  berechnet. Ein Faktor von 10 % der Absorption des Farbstoffes bei 336 nm wurde für die Berechnung der Absorption des Letzteren bei 280 nm und damit für die Korrektur der Proteinkonzentration verwendet. Die Konzentration des Zarvin-S146C betrug 109  $\mu\text{M}$  mit einer Kopplungseffizienz des Farbstoffes von etwa 0,065 Farbstoffmolekülen pro Zarvin-S146C-Molekül. Kopplungsversuche mit anderen Farbstoffen hatten gezeigt, dass die Kopplungseffizienz nicht durch eine Erhöhung des Farbstoffüberschusses werden werden kann. Aus diesem Grund wurde die D72C-Mutante des Zarvins, welche eine bessere Zugänglichkeit des Lösungsmittels zu dem Cystein aufweist, zusätzlich erzeugt.

### 2.22.3 Kopplung von Atto594-Maleimid an Zarvin-D72C

Atto594-Maleimid wurde unter analogen Bedingungen wie in Abschnitt 2.22.2 beschrieben an 4,1 mg Zarvin-D72C ( $\sim 590 \mu\text{M}$  in  $\sim 360 \mu\text{l}$  Volumen) unter Verwendung eines 1,5-fachen molaren Überschusses des Farbstoffes gekoppelt. Die Trennung des Protein-Farbstoff Konjugates von freiem Farbstoff wurde aufgrund der sehr hydrophilen Eigenschaften des Farbstoffes mit Hilfe von zwei PD-10-Säulen durchgeführt. Nach Konzentrierung mit Hilfe eines Centricons lag die Zarvin-D72C-Konzentration bei etwa 236  $\mu\text{M}$  mit einer Kopplungseffizienz des Farbstoffes von etwa 0,91 Farbstoffmolekülen pro Zarvin-D72C-Molekül. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoffes beträgt  $120000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei 601 nm, wobei 51 % des Absorptionswertes bei 601 nm bei 280 nm gelten.

### 2.22.4 Kopplung von Atto488-NHS an Cetuximab

Etwa 0,7 mg (29  $\mu\text{M}$  in 167  $\mu\text{l}$  Volumen) von in 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7,4 umgepuffertem Cetuximab wurden mit einem 8,4-fachen molaren Überschuss mit dem Farbstoff Atto488-NHS versetzt. Der Farbstoff war dabei in 610  $\mu\text{l}$  des Puffers gelöst und

wurde tropfenweise zu der Antikörper-Lösung gegeben. Die Lösung wurde nach Zugabe des Farbstoffes für 15 Minuten bei Raumtemperatur und unter mehrmaligem Durchmischen inkubiert, um eine Aggregation des Antikörpers zu minimieren. Der freie Farbstoff wurde von dem Konjugat mit Hilfe von zwei PD-10-Säulen getrennt und mittels eines Centricons konzentriert. Die Konzentration des Farbstoffes wurde anschließend über die Absorption der Lösung bei 501 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von  $90000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  berechnet. Der Korrekturfaktor für die Absorption des Farbstoffes bei 280 nm beträgt 10 % der Absorption bei 501 nm. Eine Cetuximab-Konzentration von  $11,7 \text{ } \mu\text{M}$  mit einer Kopplungseffizienz von 1,56 Farbstoffmolekülen pro Cetuximab-Molekül wurde berechnet.

Nach der Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die entsprechenden Proteine wurden die Konjugate schockgefroren und bis zu der jeweiligen Anwendung bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.23 Titrations mit Detektion der Fluoreszenzanisotropie

### 2.23.1 Titration von Zarvin-Atto465 mit Cetuximab

Die Fluoreszenzanisotropie-Messungen in dieser Arbeit wurden mit einem Cary *Eclipse* Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Bei der Titration von  $120 \text{ nM}$  Zarvin-Atto465 mit Cetuximab wurde für jeden Titrationsschritt ein neuer Ansatz mit pipettiert und anschließend die Fluoreszenzanisotropie des Farbstoffes gemessen. Die Titration wurde in  $20 \text{ mM}$  Tris,  $150 \text{ mM}$  NaCl, pH 7,4 und bei  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Der Farbstoff wurde bei  $440 \text{ nm}$  angeregt und die Emission bei  $525 \text{ nm}$  detektiert. Ein G-Faktor von 1,6848 wurde für Atto465 zum Ausgleich der unterschiedlichen Durchlässigkeit der horizontalen und vertikalen Polarisatoren für Licht dieser Wellenlängen verwendet. Die Anregungs- und Emissionsspaltbreiten betrugen bei den Messungen 10 bzw. 20 nm und die Detektorspannung 600 V. Der Anregungsfilter wurde auf die Einstellung „auto“ und der Emissionsfilter auf „open“ gestellt. Die Messungen wurden in dem Kinetik-Modus des Gerätes mit einer Mittelungszeit von 7 s und einer Gesamtmesszeit von mindestens 10 min pro Titrationsschritt durchgeführt. Die nichtlineare Regression wurde mit folgender hyperbolen Gleichung durchgeführt:

$$\Delta\text{Anisotropie} = \frac{\text{Anisotropie}_{\text{max}} \times [\text{Cetuximab}]}{K_D + [\text{Cetuximab}]} \quad (\text{Gl. 2.1}),$$

wobei  $[\text{Cetuximab}]$  die Konzentration von Cetuximab,  $\Delta\text{Anisotropie}$  die Differenz der Anisotropie bei der jeweiligen Cetuximab-Konzentration zu der Anisotropie des Zarvin-Atto465 ohne Cetuximab,  $\text{Anisotropie}_{\text{max}}$  der Anisotropiewert bei Sättigung des Zarvin-

Atto465 mit Cetuximab und  $K_D$  die Dissoziationskonstante der Bindung zwischen Zarvin-Atto465 und Cetuximab ist.

### 2.23.2 Titrationsen von Zarvin-S146C-AEDANS mit Cetuximab

Für die Titrationsen von Zarvin-S146C-AEDANS mit Cetuximab wurden 400 nM bzw. 120 nM dieses Konjugates in einem Volumen von 800 µl vorgelegt. Die entsprechende Titrierlösung des Cetuximab bestand für die 400 nM-Titration aus 10 µM Cetuximab und 400 nM Zarvin-S146C-AEDANS. Für die 120 nM-Titration bestand sie aus 5 µM Cetuximab und 120 nM Zarvin-S146C-AEDANS. Für die einzelnen Titrationsschritte wurden bei beiden Titrationsen sukzessiv Volumina der Titrierlösung zu dem Ansatz des vorgelegten Zarvin-S146C-IADANS gegeben. Die Fluoreszenzanisotropie des 1,5-IAEDANS wurde durch Anregung des Farbstoffes bei 338 nm und Detektion der Emission bei 489 nm gemessen. Für 1,5-IAEDANS wurde hier ein G-Faktor von 1,5364 verwendet. Anregungs- und Emissionsspalt betrugen jeweils 20 nm, die Detektorspannung lag bei 800 V und die Anregungs- und Emissionsfilter wurden auf die Einstellung „auto“ gestellt. Die 400 nM-Titration wurde im *Advanced Reads*-Modus des Gerätes mit einer Mittelungszeit von 12 s sowie zwei gemittelten Messungen mit jeweils fünf *Replicates* pro Titrationsschritt durchgeführt. Die 120 nM-Titration wurde im Kinetik-Modus des Gerätes mit einer gemittelten Messzeit von 10 min pro Titrationsschritt durchgeführt. Beide Titrationsen wurden in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 und bei 20 °C durchgeführt.

## 2.24 Zellkultur und Fluoreszenzmikroskopie

Die Bindung des Komplexes Cetuximab:Zarvin-D72C-Atto594 an EGF-Rezeptoren (EGF: *Epidermal Growth Factor*) in der Zellmembran humaner A431-Zellen wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie (Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim) sichtbar gemacht. Bei einem Konfokalmikroskop befindet sich im Gegensatz zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop eine Lochblende vor dem Detektor, die so positioniert ist, dass fast ausschließlich nur solches von der Probe emittiertes Licht den Detektor erreicht, welches sich im Brennpunkt der Linsen des Mikroskopes befindet. Von der Probe emittiertes Licht, das sich nicht im Brennpunkt der Linsen befindet, wird von Letzteren so gebrochen, dass es nicht auf die Öffnung der Lochblende trifft. Dadurch hat ein Konfokalmikroskop sowohl horizontal als auch vertikal eine bessere Auflösung [121], muss allerdings mit Hilfe der Beweglichkeit der Spiegel rasterförmig die gesamte Probe



„abtasten“, um ein Gesamtbild der Probe zu produzieren. Die bessere vertikale Auflösung war hier insbesondere für Schichtaufnahmen durch die A431-Zellen von Vorteil.

Die A431-Zellen wurden für die Experimente auf  $\mu$ -Slide 8-Loch-Platten (Ibidi, Martinsried) bis zu Dichten zwischen  $10^5$  und  $10^6$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  wachsen gelassen. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit einem Gemisch aus etwa  $7,8 \mu\text{M}$  Cetuximab und etwa  $14 \mu\text{M}$  Zarvin-D72C-Atto594 (ca.  $200 \mu\text{l}$  Volumen) über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  oder für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der verwendete Puffer bestand aus  $25 \text{ mM}$  HEPES,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $4 \text{ mM}$  KCl, pH 7,4. Die A431-Zellen waren in diesem Puffer über mehrere Tage vital. Als Kontrolle dienten Inkubationen der Zellen mit Lösungen, die nur Cetuximab, nur Zarvin-D72C-Atto594 (selbe Konzentrationen wie in dem Gemisch) oder keines der beiden Proteine (nur Puffer) enthielten. Nach der Inkubation wurden nicht an die Zellen gebundene Cetuximab:Zarvin-D72C-Atto594-Komplexe durch fünf Waschschriffe mit dem HEPES-Puffer von der Lochplatte entfernt. Während der Mikroskopie wurden die lebenden Zellen (keine Fixierung) mit dem HEPES-Puffer und zusätzlich  $10\%$  fötalem Kälberserum bedeckt.

Der Farbstoff Atto594 wurde mit einem  $594 \text{ nm}$  Laser ( $50\%$  Intensität) des Mikroskopes angeregt. Die Emission wurde in einem Bereich von  $605$  bis  $750 \text{ nm}$  mit einer Detektorspannung zwischen  $700$  und  $800 \text{ V}$  detektiert. Die Autofluoreszenz der A431-Zellen der Kontrollansätze wurde durch Anregung mit einem  $405 \text{ nm}$  Diodenlaser und Detektion der Fluoreszenz zwischen  $417$  und  $502 \text{ nm}$  gemessen. Die Laserintensität betrug hier  $70\%$  und die Detektorspannung  $820 \text{ V}$ . Die Bilder wurden mit einer Auflösung von  $8 \text{ bit}$ , einer Größe von  $1024 \times 1024$  Pixeln, einer Mittelung von  $8 \text{ Scans}$  pro horizontaler Linie des Bildes und einer *Scan*-Geschwindigkeit von  $200$  Pixeln pro Sekunde aufgenommen. Schichtaufnahmen entlang der Z-Achse wurden mit einer Schichtdicke von  $0,13 \mu\text{M}$ , einer Größe von  $1024 \times 1024$  Pixeln, einer Mittelung von  $2 \text{ Scans}$  pro horizontaler Linie des Bildes und einer *Scan*-Geschwindigkeit von  $400$  Pixeln pro Sekunde aufgenommen. Für die in Abbildung 3.14 dargestellten Zellbilder bzw. die 3D-Rekonstruktion wurden allerdings nicht sämtliche aufgenommenen Schichten verwendet (siehe Bildunterschrift von Abb. 3.14). Die Prozessierung der Bilder in Bezug auf die Anpassung von Helligkeit und Kontrast wurde mit dem Programm Image J 1.46r durchgeführt.

## 2.25 Terbium(III)-Lumineszenz und Metallionen-Titrationen

### 2.25.1 Grundlagen der Terbium(III)-Lumineszenz

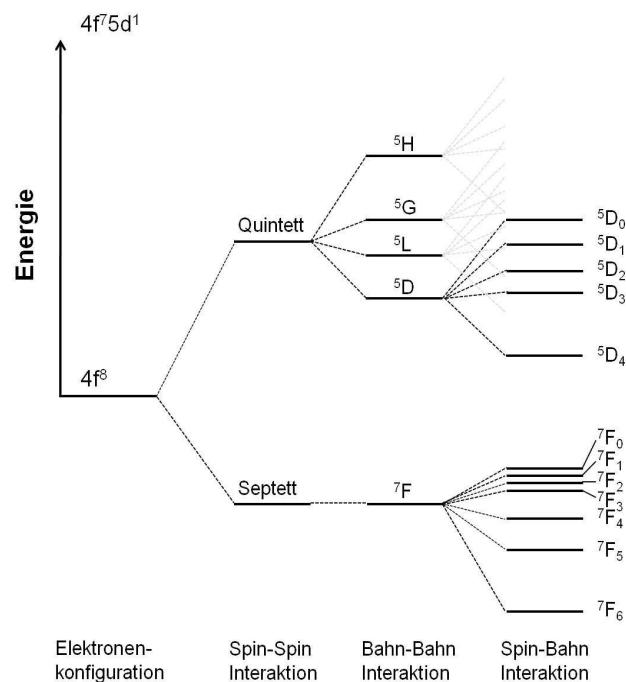
Für eine messbare Lumineszenz von Terbium(III) ist es notwendig, dass das Metallion von einem mehrzähligen Liganden komplexiert wird. Ohne ein solches sogenanntes Ligandenfeld ist das Metallion so gut wie nicht in der Lage, Licht zu absorbieren und in Form von Lumineszenz wieder zu emittieren. Das physikalische Prinzip der Terbium(III)-Lumineszenz beruht auf Mehrelektronenzuständen und der Ligandenfeld-Theorie. Beide Begriffe werden im Folgenden erläutert. In der 4f-Unterschale von Terbium(III) befinden sich acht Elektronen, wobei 14 Elektronen in den sieben 4f-Orbitalen Platz hätten. Die acht Elektronen des Terbium(III) haben dadurch mehrere Möglichkeiten, sich auf die sieben Orbitale zu verteilen. Der energieärmste Zustand entsteht, wenn sich alle Elektronen entsprechend den Hundschen Regeln verteilen, wobei zunächst jedes Orbital, angefangen bei der höchsten positiven Magnetquantenzahl  $m_l$ , mit einem Elektron besetzt wird und erst anschließend in derselben Reihenfolge Spinpaarungen gebildet werden (Abb. 2.3).

	$m_l$	+3	+2	+1	0	-1	-2	-3
4f		$\uparrow\downarrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$

**Abb. 2.3:** Verteilung der acht 4f-Elektronen des Terbium(III) auf die sieben 4f-Orbitale entsprechend den Hundschen Regeln. Dabei wird zunächst jedes Orbital, beginnend bei dem Orbital mit der höchsten positiven Magnetquantenzahl  $m_l$ , mit einem Elektron besetzt, bevor in derselben Reihenfolge Spinpaarungen gebildet werden.

Allerdings sind auch von den Hundschen Regeln abweichende Verteilungen möglich, sodass es mehrere Mehrelektronenzustände gibt, die z. T. unterschiedliche Energien aufweisen. Die Energieunterschiede kommen dabei durch Interaktionen der Eigendrehimpulse (Spins) freier Elektronen in der Unterschale (Spin-Spin Interaktionen), durch Interaktionen der Bahndrehimpulse der Elektronen untereinander (Bahn-Bahn Interaktionen) sowie durch Interaktionen der Spin- und Bahndrehimpulse in der Unterschale (Spin-Bahn Interaktionen) zustande. Bei Lanthanoiden interagieren in erster Linie der Eigendreh- ( $s$ ) sowie der Bahndrehimpuls ( $l$ ) eines freien Elektrons miteinander (Spin-Bahn-Interaktion), wobei sich der Drehimpuls dieses Elektrons mit  $j = s + l$  ergibt. Die  $j$ -Werte aller freien Elektronen in der 4f-Unterschale addieren sich zusätzlich über die schwächeren Spin-Spin- und Bahn-Bahn-Interaktionen zu einem Gesamt-Drehimpuls  $J$ . Je nach Verteilung der acht Elektronen auf die f-Unterschale sind diese quantenmechanischen Interaktionen etwas unterschiedlich ausgeprägt und erzeugen damit energetisch verschiedene Mehrelektronenzustände. Die Mehrelektronenzustände der Lanthanoide lassen sich meistens ohne Korrektur mit Hilfe der

Russell-Saunders-Kopplung (LS-Kopplung) näherungsweise beschreiben. Die LS-Kopplung, die auf leichtere Atome und Ionen angewendet wird, geht davon aus, dass Spin-Spin-Interaktionen am stärksten sind, gefolgt von Bahn-Bahn- und anschließend Spin-Bahn-Interaktionen. Dabei werden die unterschiedlichen Mehrelektronenzustände analog zu den Quantenzahlen bei Eielektronenzuständen ( $n$ ,  $l$ ,  $m_l$ ,  $s$ ) durch sog. Termsymbole charakterisiert. Diese Termsymbole der Form  $^{2S+1}L_J$  setzen sich aus der Gesamt-Spinquantenzahl  $S$ , der Gesamt-Bahndrehimpulsquantenzahl  $L$  und der Gesamt-Drehimpulsquantenzahl  $J$  zusammen. Abbildung 2.4 zeigt das Termschema von Terbium(III).



**Abb. 2.4:** Termschema von Terbium(III) ohne Ligandenfeld. Lumineszenzübergänge finden, nach Anregung des  $\text{Tb}^{3+}$  vom  $^7\text{F}_6$ -Grundterm in den  $^5\text{D}_4$ -Unterterm, zu den  $^7\text{F}_6$ - bis  $^7\text{F}_0$ -Untertermen statt. Ein asymmetrisches Ligandenfeld sowie die indirekte Anregung des  $\text{Tb}^{3+}$  mittels eines Energietransfers über eine Molekülgruppe des Ligandenfeldes erhöhen die ansonsten kaum messbare Lumineszenzintensität. Dennoch nicht mehr gut messbar sind dabei in der Regel die Übergänge in die Unterterme  $^7\text{F}_0$ ,  $^7\text{F}_1$  und  $^7\text{F}_2$ . Abbildung modifiziert nach [122].

Die Gesamt-Spinquantenzahl  $S$  ergibt sich dabei als Summe der Spin-Quantenzahlen  $s = +\frac{1}{2}$  aller freien Elektronen in der betrachteten Unterschale, wobei  $2S+1$  die sog. Spinmultiplizität ist. Letztere beschreibt die Anzahl der zunächst als energiegleich (entartet) betrachteten Zustände in Bezug auf die Verteilung der Elektronen in der Unterschale und wird mit  $2S+1 = 1, 2, 3, \dots$  als Singulett, Dublett, Triplett usw. bezeichnet. Die entarteten Zustände werden dabei mit magnetischen Gesamt-Spinquantenzahlen  $M_S = +S, +S-1, \dots, 0, \dots, -S+1, -S$  bezeichnet.  $S$  und damit  $2S+1$  können je nach Verteilung der Elektronen verschiedene Werte annehmen, wobei der Zustand mit der höchsten Anzahl an ungepaarten Elektronen und damit der höchsten Spinmultiplizität der energieärmste ist (gepaarte Elektronen stoßen sich

ab, was einen höheren Energiezustand erzeugt). Der größte Wert von  $S$  und damit auch die höchste Spinmultiplizität ergibt sich bei einer Verteilung nach den Hundschen Regeln (siehe Abb. 2.3). Für Terbium(III) mit acht 4f-Elektronen, von denen nach Hund sechs ungepaart sind, ergibt sich  $S = 6 \times \frac{1}{2} = 3$  und  $2S+1 = 7$ , mit  $M_S = +3, +2, +1, 0, -1, -2, -3$ . Bei dieser Verteilung mit sechs freien Elektronen ergeben sich also zunächst sieben entartete Mehrelektronenzustände. Die Gesamt-Bahndrehimpulsquantenzahl  $L$  ergibt sich als Summe der ganzzahligen Magnetquantenzahlen  $m_l$  der auf die sieben 4f-Orbitale verteilten Elektronen. Dabei werden dieser Summe nach aufsteigender Zahlenfolge 0, 1, 2... die Großbuchstaben S, P, D, F, G, H, I... zugeordnet. Die durch Spin-Spin-Interaktionen entarteten Mehrelektronenzustände gleicher Spinmultiplizität befinden sich durch unterschiedliche mögliche Gesamt-Bahndrehimpulse auf etwas unterschiedlichen Energieniveaus. Bei gleicher Spinmultiplizität ist dabei der Mehrelektronenzustand mit dem höchsten Bahndrehimpuls am stabilsten und damit am energieärmsten. Im Falle von Terbium(III) gibt es bei der höchsten Spinmultiplizität von sieben und im energieärmsten Zustand nach Hund nur einen möglichen Gesamt-Bahndrehimpuls von  $L = 3 = F$  (siehe Abb. 2.3 und Abb. 2.4). Allerdings gibt es bei Terbium(III) auch Mehrelektronenzustände mit vier freien Elektronen und damit  $2S+1 = 5$ . Dabei befinden sich die fünf zunächst entarteten Zustände aufgrund von vier verschiedenen möglichen Gesamt-Bahndrehimpulsen mit  $L = D, L, G$  und  $H$  auf vier leicht unterschiedlichen Energieniveaus. Es entstehen also bei Terbium(III) durch Spin-Spin- und Bahn-Bahn-Interaktionen der Grundterm  $^7F$ , sowie die energetisch höher liegenden Terme  $^5D$ ,  $^5L$ ,  $^5G$  und  $^5H$  (Abb. 2.4). Durch Spin-Bahn-Interaktionen zwischen den Elektronen werden weiterhin die zuvor der Einfachheit halber als entartet betrachteten Zustände, die durch Spin-Spin-Interaktionen zustande kommen, energetisch aufgesplittet (Abb. 2.4). Dabei entsteht entsprechend der Spinmultiplizität eine Anzahl von  $2S+1$  Untertermen, die durch die Gesamt-Drehimpulsquantenzahl  $J$  unterschieden werden. Letztere wird als  $J = L + M_S$  mit  $M_S = +S, ..., 0, ..., -S$  gebildet. Im Falle des Grundterms von Terbium(III) ergeben sich mit  $L = 3$  und  $M_S$ -Werten von  $+3$  bis  $-3$   $J$ -Werte von Null bis Sechs. Dasselbe Prinzip gilt für die höher gelegenen Terme der Spinmultiplizität  $2S+1 = 5$ , wobei jeweils fünf Unterterme mit  $J = 0, 1, 2, 3, 4$  entstehen (Abb. 2.4). Das energetisch niedrigste Niveau von Terbium(III), der Grundzustand, liegt bei dem  $^7F_6$ -Unterterm.

Durch Absorption von Licht im UV-Vis-Bereich ist es möglich, dass Terbium(III) in den  $^5D_4$ -Mehrelektronenzustand wechselt und anschließend durch Energieabgabe wieder in einen der  $^7F$ -Unterterme übergeht. Für den Wechsel in den  $^5D_4$ -Unterterm muss eines der sechs ungepaarten Elektronen in das Orbital mit der nächst niedrigeren Magnetquantenzahl  $m_l$

wechseln und eine Spinpaarung mit dem dortigen Elektron bilden, wodurch ein Orbital gänzlich frei wird. Da ein solcher Elektronenübergang mit einem Wechsel der Spinmultiplizität (von sieben auf fünf) aus quantenmechanischen Gründen verboten ist (Interkombinationsverbot), tritt dieses Phänomen nur sehr selten auf, woraus der geringe Extinktionskoeffizient von Terbium(III) ( $\epsilon \approx 0,1 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) resultiert. Wird das Metallion aber von einem nicht-kugelsymmetrischen Ligandenfeld komplexiert, dann stoßen die negativen Ladungen der Liganden die Elektronen der einzelnen f-Orbitale unterschiedlich stark ab. Die Energie der einzelnen f-Orbitale ist dadurch nicht mehr entartet, sondern nimmt unterschiedliche Beträge an. Dadurch spalten auch die Terme der Mehrelektronenzustände in sog. Spaltterme auf, was als Ligandenfeld-Theorie bezeichnet wird. Diese Aufspaltung erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Elektronenübergangs vom  $^7\text{F}_6$ -Zustand in einen Spaltterm des  $^5\text{D}_4$ -Zustandes, woraus eine stärkere Lumineszenzintensität des Terbium(III) resultiert. Dieser Abschnitt wurde frei formuliert nach [28] S. 96-98, S. 1937-1938; [123] S. 662-664; [124–127].

Die ligandenfeldabhängige Lumineszenz von Terbium(III) wurde in der vorliegenden Arbeit dazu genutzt, bei Titrationen den Sättigungsgrad eines Liganden mit dem Metallion zu messen.<sup>2</sup>

### 2.25.2 Metallionen-Titrationen auf Basis der Terbium(III)-Lumineszenz

Die Terbium(III)-Lumineszenz-Messungen im Zusammenhang mit Metallionen-Titrationen des Zarvins wurden mit Hilfe eines Cary *Eclipse* Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Das  $\text{Tb}^{3+}$  wurde dabei indirekt über ein Phenylalanin zwischen der CD- und der EF-Bindestelle der Parvalbumin-Domäne mit einer Wellenlänge von 258 nm angeregt. Die Lumineszenz-Emission des  $\text{Tb}^{3+}$  wurde bei 543 nm ( $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$  Übergang) mit einer Verzögerungszeit zwischen 0,15 und 0,5 ms, einer Gate-Zeit zwischen 2,9 und 4,5 ms und einer totalen Abklingzeit für die Lumineszenz von 200 ms detektiert. Die Anregungs- und Emissionsspaltbreiten wurden in der Regel auf 10 bzw. 20 nm gesetzt (Die Anregungsspektren in Abb. 3.18 wurden mit Anregungs- und Emissionsspaltbreiten von 5 bzw. 10 nm aufgenommen), der Anregungsfilter auf „auto“ und der Emissionsspalt auf ein Fenster von 360 bis 1100 nm. Die Detektorspannung betrug bei den Messungen zwischen 600 und 800 V. Dabei wurde jeder Titrationsschritt in einem neuen Ansatz pipettiert und im Falle der Competitiontitrationen für zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Ausbildung eines Gleichgewichtes zu gewährleisten. Die Ansätze der

---

<sup>2</sup> Der Abschnitt 2.25.1 wurde bereits wörtlich in meiner Masterarbeit verwendet, die aufgrund eines Fast-Track-Programmes innerhalb der Promotionszeit geschrieben wurde.

einzelnen Titrationsschritte wurden anschließend in dem Kinetikmodus des Gerätes mit einer Mittelungszeit von 7 s und über einen Zeitraum von je 10 Minuten gemessen.

Die Abschätzung der Bindungsaffinität zwischen  $\text{Tb}^{3+}$  und der höher affinen EF-Bindestelle der Parvalbumin-Domäne mit Hilfe der Kompetition durch den Chelator NTA wurde in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Aus Titrationen von 3  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  und 8  $\mu\text{M}$  Zarvin mit NTA wurden  $\text{IC}_{50}$ - bzw. durch nichtlineare Regression mit der Hill-Gleichung apparente  $K_D$ -Werte  $K_{\text{app}}$  für den Komplex  $\text{NTA}:\text{Tb}^{3+}$  zwischen etwa 150  $\mu\text{M}$  und 170  $\mu\text{M}$  berechnet. Zusammen mit der wahren Bindungsaffinität dieses Komplexes aus der Literatur von  $5,6 \times 10^{-12}$  M [128] ( $K_D^{\text{NTA}}$ ) ergeben sich entsprechend folgender Gleichung [129] Affinitäten für den Zarvin:EF-Komplex zwischen  $2,6 - 3,0 \times 10^{-12}$  M:

$$K_D^{\text{Zarvin}} = \frac{K_D^{\text{NTA}} \times [\text{Zarvin}]}{K_{\text{app}} - K_D^{\text{NTA}}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

mit [Zarvin] als der vorgelegten Zarvin-Konzentration (8  $\mu\text{M}$ ). Bei der umgekehrten Vorgehensweise der Titration von 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  und 100  $\mu\text{M}$  mit Zarvin wurde ein  $\text{IC}_{50}$ - bzw.  $K_{\text{app}}$ -Wert für den Zarvin:EF-Komplex von etwa 6,1  $\mu\text{M}$  gemessen. Mit Hilfe der Bindungsaffinität des  $\text{NTA}:\text{Tb}^{3+}$ -Komplexes von  $5,6 \times 10^{-12}$  M und folgender umgestellter Form von Gleichung 2.2 wurde hier ein  $K_D$ -Wert für die Bindung des Zarvin:EF-Komplexes von etwa  $3,4 \times 10^{-13}$  M berechnet:

$$K_D^{\text{Zarvin}} = \frac{K_{\text{app}} \times K_D^{\text{NTA}}}{K_D^{\text{NTA}} + [\text{NTA}]} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

mit [NTA] als der vorgelegten NTA-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ). Die Verdrängungstitrationen von an Zarvin gebundenem  $\text{Tb}^{3+}$  durch die Metallionen  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  bzw.  $\text{Zn}^{2+}$  wurden in dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 15 mM Bis-Tris, pH 7,4 durchgeführt. Die niedrig affine Bindung von Metallionen durch Bis-Tris wurde hier dafür genutzt, dass verdrängtes  $\text{Tb}^{3+}$  keine Lumineszenzeffekte durch eine ansonsten auftretende Bindung an Küvettenwände verursacht. Die Bindungsaffinität des Bis-Tris: $\text{Tb}^{3+}$ -Komplexes ist allerdings so niedrig (~180  $\mu\text{M}$  über eine Kompetitionstitration mit an die Küvettenwand gebundenem und lumineszierendem  $\text{Tb}^{3+}$  abgeschätzt), dass die Kompetition der Bis-Tris:Metallionen-Komplexe mit den Zarvin:Metallionen-Komplexen vernachlässigt werden kann. Bei den Verdrängungstitrationen wurden jeweils 4  $\mu\text{M}$  Zarvin und 10  $\mu\text{M}$   $\text{Tb}^{3+}$  vorgelegt. Jeder Titrationsschritt wurde auch hier separat pipettiert. Folgende monophasische Kompetitionsgleichung [130] wurde mittels nichtlinearer Regression in die Datenpunkte der Verdrängungskurven von  $\text{Gd}^{3+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  eingepasst:

$$I_{\text{Tb}^{3+}} = \frac{I_{\text{Tb}^{3+}\text{max}} \times K_{\text{app}}}{K_{\text{app}} + [\text{M}]} + I_{\text{Tb}^{3+}\text{min}} \quad (\text{Gl. 2.4}),$$

wobei  $[\text{M}]$  die Konzentration des hinzu titrierten Metallions bei dem jeweiligen Titrationsschritt,  $I_{\text{Tb}^{3+}}$  die gemessene Lumineszenzintensität bei dem jeweiligen Titrationsschritt,  $I_{\text{Tb}^{3+}\text{max}}$  die Lumineszenzintensität bei 0  $\mu\text{M}$  NTA und  $I_{\text{Tb}^{3+}\text{min}}$  die Lumineszenzintensität bei nicht mehr vorhandenen Zarvin: $\text{Tb}^{3+}$ -Komplexen beschreibt. Mit Hilfe dieser Regression wurden die  $K_{\text{app}}$ -Werte für die Bindung von  $\text{Gd}^{3+}$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  an die EF-Bindestelle von Zarvin geschätzt. Die entsprechenden  $K_{\text{D}}$ -Werte dieser Interaktionen wurden mit einer zu Gleichung 2.3 analogen Kompetitionsleichung berechnet:

$$K_{\text{D}}^{\text{Metallion}} = \frac{K_{\text{app}} \times K_{\text{D}}^{\text{Tb}^{3+}}}{K_{\text{D}}^{\text{Tb}^{3+}} + [\text{Tb}^{3+}]} \quad (\text{Gl. 2.5}),$$

wobei  $K_{\text{D}}^{\text{Tb}^{3+}}$  die zuvor geschätzte Affinität der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an die EF-Bindestelle des Zarvins beschreibt. Hier wurde der zwischen den beiden Titrationsarten liegende Wert von  $3,0 \times 10^{-12}$  M verwendet.  $[\text{Tb}^{3+}]$  ist die vorgelegte  $\text{Tb}^{3+}$ -Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ).

## 2.26 Relaxometrie

Die relaxometrische Charakterisierung des Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes wurde bei den drei Feldstärken 1,5 T, 3 T und 7 Tesla und bei Raumtemperatur durchgeführt. Dafür wurden die Ganzkörper-MRT-Scanner Magnetom Aera, Skyra und 7 T (Siemens Healthcare Sector, Erlangen) verwendet, welche eine Gradientenstärke von 45 mT/m (70 mT/m bei 7 T) und eine Anstiegsrate von 200 mT/m/s aufweisen. Für die Messung der Relaxivitäten  $r_1$  des Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes bei den drei Feldstärken wurde eine Verdünnungsreihe des Komplexes in dem Puffer 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, pH 7,4 in einem Volumen von je 2,9 ml pipettiert. Die Konzentrationen des Komplexes betrugen dabei 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 0  $\mu\text{M}$  (bezogen auf Zarvin). Dabei wurde das Zarvin leicht mit  $\text{Gd}^{3+}$  untersättigt, sodass die  $\text{Gd}^{3+}$ -Konzentrationen 39,5  $\mu\text{M}$ , 19,7  $\mu\text{M}$ , 9,9  $\mu\text{M}$ , 1,97  $\mu\text{M}$ , 0,99  $\mu\text{M}$  und 0  $\mu\text{M}$  betrugen. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte (4x6 well TC-Plate, Greiner bio-one, Solingen) gefüllt. Eine zweite Verdünnungsreihe des Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes wurde zusätzlich in Anwesenheit des IgG-Antikörpers Cetuximab pipettiert, wobei der Antikörper in einer Stöchiometrie von 1:2 zu dem Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplex hinzugegeben wurde. Die Konzentrationen des Zarvin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes betrugen hier 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  und 0,02  $\mu\text{M}$ . Wie bei der ersten Verdünnungsreihe wurde das Zarvin auch hier in den meisten Ansätzen leicht mit

$\text{Gd}^{3+}$  untersättigt, sodass die  $\text{Gd}^{3+}$ -Konzentrationen 19,73  $\mu\text{M}$ , 3,95  $\mu\text{M}$ , 1,97  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$  und 0,04  $\mu\text{M}$  betrugen.

Die Loch-Platte mit beiden Verdünnungsreihen wurde für die Messungen an den MRT-Geräten in einer Radiofrequenz-Spule positioniert. Bei 1,5 T und 3 T wurde eine 16-Kanal Empfänger-Handgelenks-Spule (Siemens Healthcare Sector) verwendet. Bei 7 T wurde eine 32-Kanal Sende-/Empfänger Kopf-Spule (Nova Medical, New York, USA) verwendet. Für die Messung der  $T_1$ -Relaxationszeiten der einzelnen Verdünnungsstufen wurden *Inversion Recovery Turbo Spin Echo* (IR-TSE) Sequenzen mit den folgenden Parametern verwendet: Inversionszeiten (TI) zwischen 20 und 2500 ms; Repetitionszeit/Echozeit (TR/TE) von 12500/6,8 ms; *Field of view* (FoV) read: 180 mm, FoV phase: 100,0 %; Frequenzauflösung: 384; Phasenauflösung: 100 %; Bandbreite: 395 Hz/Pixel; Schichtdicke: 3 mm; Präparationspuls: 180°, Turbo-Faktor: 11. Die Auflösung der aufgenommenen Bilder wurde aus FoV/Matrix in *READ*  $\times$  *PHASE* und der Schichtdicke berechnet, sodass sich 0,5 mm  $\times$  0,5 mm  $\times$  3 mm = 0,75 mm<sup>3</sup> als Auflösung ergeben. Diejenige Inversionszeit  $\text{TI}_0$ , die das MRT-Signal einer Verdünnungsstufe nullt (die Vertiefung dieser Verdünnungsstufe erscheint auf dem MRT-Bild schwarz), wurde über folgende Gleichung [131] für die Berechnung der  $T_1$ -Relaxationszeit dieser Verdünnungsstufe verwendet:

$$T_1 = -\text{TI}_0 / \ln(0,5) \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Die  $T_1$ -Relaxationszeiten jeder einzelnen Verdünnungsstufe beider Verdünnungsreihen wurde auf diese Art berechnet (MRT-Bilder siehe Anhang H). Die Relaxivitäten  $r_1$  des  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes sowie des Komplexes in Anwesenheit von Cetuximab bei den drei Feldstärken wurde mittels linearer Regression der Auftragung von  $1/T_1 - 1/T_1^{\text{Puffer}}$  gegen die  $\text{Gd}^{3+}$ -Konzentration der jeweiligen Verdünnungsstufe berechnet, wobei  $T_1$  die berechnete  $T_1$ -Relaxationszeit der jeweiligen Verdünnungsstufe und  $T_1^{\text{Puffer}}$  die berechnete  $T_1$ -Relaxationszeit der 0  $\mu\text{M}$  Verdünnungsstufe sind. Für die Auswertung siehe Abschnitt 3.8.

## 2.27 Nichtlineare Regression mit kinetischen Daten

Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{off}}$  und die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  kinetischer Prozesse, die in dieser Arbeit dargestellt werden, wurden durch nichtlineare Regression mit Hilfe einer mono- oder einer biexponentiellen Gleichung ermittelt. Diese Gleichungen befinden sich standardmäßig in dem Programm GraphPad Prism 5.04, welches für alle Regressionen in dieser Arbeit benutzt wurde. Die monoexponentielle Gleichung hat die Form

$$y = (y_0 - \text{Plateau}) \times e^{-k_{\text{off}} \times x} + \text{Plateau} \quad (\text{Gl. 2.7})$$



mit  $y$  als der jeweiligen Signalintensität am Zeitpunkt  $t$  ( $x$  entspricht hier der Zeit  $t$ ),  $y_0$  als der Signalintensität zu Beginn der Messung und Plateau als dem Sättigungswert der Kinetik. Für biphasische Prozesse wurde folgende Form einer biexponentiellen Gleichung verwendet:

$$y = \text{SpanFast} \times e^{-k_{\text{off}}^{\text{fast}} \times x} + \text{SpanSlow} \times e^{-k_{\text{off}}^{\text{slow}} \times x} + \text{Plateau} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

mit  $\text{SpanFast} = (y_0 - \text{Plateau}) \times \text{PercentFast} \times 0,01$

und  $\text{SpanSlow} = (y_0 - \text{Plateau}) \times (100 - \text{PercentFast}) \times 0,01$

$\text{SpanFast}$  und  $\text{SpanSlow}$  entsprechen dabei den Anteilen der schnellen und der langsamen Phase der Kinetik an der gesamten Intensitätsdifferenz ( $y_0 - \text{Plateau}$ ). Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten der beiden Phasen werden als  $k_{\text{off}}^{\text{fast}}$  und  $k_{\text{off}}^{\text{slow}}$  bezeichnet. Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  werden sowohl bei mono-, als auch bei biexponentiellen Kinetiken als  $\ln 2 / k_{\text{off}}$  berechnet.

## 2.28 Dissoziationskinetiken des Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplexes

Für die Messung der Dissoziationskinetik des Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplexes in FKS wurde eine Stocklösung mit 1100 µM Zarvin mit 1900 µM Tb<sup>3+</sup> in 20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, pH 6,2 für etwa eine Stunde auf Eis vorinkubiert. Die leichte Untersättigung der Bindestellen mit Tb<sup>3+</sup> diente dem Vermeiden von Effekten des freien Tb<sup>3+</sup> auf die gemessene Kinetik. 760 µl FKS wurden vor Zugabe des Protein-Metall-Komplexes zwecks Äquilibration auf 20 °C in einer Küvette in dem Fluoreszenzspektrometer für mehrere Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden 40 µl des auf Raumtemperatur äquilibrierten Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplexes zu dem FKS gegeben, sodass Zarvin auf eine Endkonzentration von 55,1 µM und Tb<sup>3+</sup> auf 94,8 µM verdünnt wurde. Das FKS wurde dabei auf 95 % verdünnt. Die Kinetik-Messung wurde bereits vor Zugabe des Protein-Metall-Komplexes in dem Kinetik-Modus des Gerätes gestartet, sodass zunächst eine Basislinie aufgenommen wurde. Die Parameter für die Messungen waren analog zu denen in Abschnitt 2.25 für die Metallionen-Titrationsen. In Phosphatpuffer gemessene Dissoziationskinetiken (Anhang L) wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt. Bei sehr schnellen Dissoziationen wurde allerdings eine Verzögerungszeit von nur 0,1 ms und eine totale Abklingzeit von nur 5 ms verwendet.

## 2.29 FRET-Kinetiken

Die Dissoziationskinetiken eines Gemisches aus 100 nM Cetuximab-Atto488 und 500 nM Zarvin-D72C-Atto594 bei verschiedenen Temperaturen wurden in PBS, pH 7,4 durchgeführt.

Es wurden zunächst 5 µM Cetuximab in einem Volumen von 74,2 µl (in einer 3×3 mm Küvette) für etwa zwei Minuten bei der jeweiligen Temperatur in dem Fluoreszenzspektrometer vorinkubiert. Anschließend wurden 0,8 µl eines vorinkubierten 94,75-fachen Gemisches der beiden fluoreszenzmarkierten Proteine hinzugefügt, sodass diese die jeweiligen Endkonzentrationen von 100 bzw. 500 nM hatten. Die Dissoziation des Komplexes Cetuximab-Atto488:Zarvin-D72C-Atto594 über die Zeit wurde durch Anregung des Atto488 Farbstoffes bei 465 nm und Detektion der Atto594-Emission bei 623 nm gemessen. Die Anregungs- und Emissionsspaltbreiten wurden dabei auf 5 bzw. 20 nm gesetzt, der Anregungsfilter auf die Einstellung „auto“ und der Emissionsfilter auf die Einstellung „open“. Die Mittelungszeit des Gerätes wurde auf 2 s und die Detektorspannung auf 700 V gestellt.

### 2.30 Kovalente Verknüpfung von Zarvin und Cetuximab

Die kovalente Verknüpfung von Zarvin und Cetuximab über den heterobifunktionalen *Crosslinker* Sulfosuccinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoat (Sulfo-LC-SDA mit Amingruppe und unspezifischer photoreaktiver Diaziriningruppe als Kopplungsfunktionalitäten) wurde zweimal unter jeweils leicht verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Für beide Ansätze wurden jeweils etwa 0,9 mg Zarvin zunächst mit Hilfe eines 2 ml-Centricons in den Puffer 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,3 umgepuffert und auf ein Volumen von ca. 200 µl einkonzentriert (0,83 mg Protein, 215 µM). Bei dem ersten Ansatz (im Weiteren als Ansatz 1 bezeichnet) wurden anschließend zu den 200 µl Zarvin 50 µl einer 10 mM Lösung des *Crosslinkers* hinzugefügt, sodass dieser mit einer Endkonzentration von 2 mM und damit in einem etwa 11,6-fachen Überschuss gegenüber dem Protein vorlag. Der Ansatz wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert, sodass die aminreaktive Seite des *Crosslinkers* an den N-Terminus und an Lysine des Zarvins koppeln konnte. Danach wurde ungebundener *Crosslinker* über ein 2 ml-Centricon herausgewaschen und das Zarvin mit gebundenem *Crosslinker* auf etwa 200 µl einkonzentriert. Das Absorptionsspektrum des Proteins hatte sich unterhalb 300 nm durch den gebundenen *Crosslinker* nicht sichtbar verändert, weshalb die Konzentration des Proteins wie in Abschnitt 2.16 beschrieben quantifiziert wurde. Die Konzentration des Zarvins betrug dabei etwa 50 µM. Anschließend wurde Zarvin-Sulfo-LC-SDA in einem Verhältnis von 1:1 mit Cetuximab gemischt, wobei die Endkonzentration der beiden Proteine bei 10 µM lag (oben genannter Phosphat-Puffer wurde für die Verdünnung verwendet). Einmal 50 µl sowie einmal 100 µl dieses Gemisches wurden in jeweils eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Greiner bio-one, Solingen) gefüllt und diese unter eine

100 Watt UV-Lampe (UVIS / 131100, Desaga GmbH, Heidelberg) gestellt. Die beiden Proben wurden zunächst 15 Min in einem Abstand von etwa 15 cm zur UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt, um die photoreaktive Diazirierunggruppe des *Crosslinkers* zu aktivieren. Es wurden dann je 10 µl aus beiden Vertiefungen für ein Schägger-Jagow-Gel entnommen. Anschließend wurden die Proben in einem Abstand von etwa 6 cm für weitere 30 Minuten bestrahlt. Nach erneuter Entnahme von 10 µl des Ansatzes wurde letzterer für noch einmal zwei Stunden bei diesem Abstand bestrahlt.

Der zweite *Crosslinking*-Ansatz (Ansatz 2) wurde nur mit leicht unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Es wurden dabei 100 µl des in den Phosphat-Puffer umgepufferten Zarvins (215 µM) mit 30 µl einer 10 mM Lösung des *Crosslinkers* gemischt, sodass Letzterer in einer Konzentration von etwa 2,3 mM und mit einem knapp 14-fachen Überschuss gegenüber dem Zarvin vorlag. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Die aminreaktive Kopplung des *Crosslinkers* wurde dann durch Hinzufügen von 50 mM Tris zu dem Ansatz gestoppt (5 Minuten Inkubation). Anschließend wurde der ungebundene *Crosslinker* über ein 2 ml-Centricon entfernt. Zarvin-Sulfo-LC-SDA des Ansatzes 2 wurde ebenfalls mit einer Konzentration von 10 µM und einem Verhältnis von 1:1 mit Cetuximab gemischt. Die Aktivierung der photoreaktiven Gruppe wurde analog zu der Behandlung des Ansatzes 1 durchgeführt.

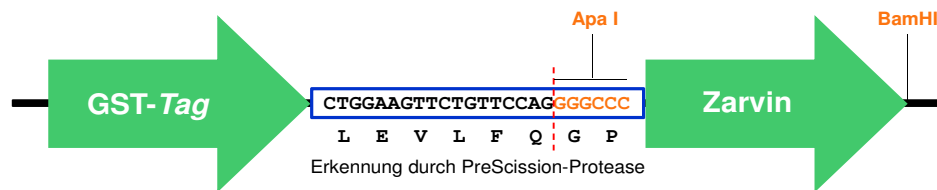
Die Aliquots, die den beiden *Crosslinking*-Reaktionen (basierend sowohl auf Ansatz 1 als auch auf Ansatz 2) nach den drei Zeitpunkten entnommen wurden, wurden mit Hilfe eines Schägger-Jagow-Gels auf eine Bande des *Crosslinking*-Produktes aus Zarvin und Cetuximab hin untersucht. Dabei erwies sich die Reaktion basierend auf Ansatz 1 als etwas effizienter. Zwischen den Bestrahlungszeitpunkten nach 15 und nach weiteren 30 Minuten (auch bei geringerem Abstand zur UV-Lampe) zeigte sich ein deutlicherer Unterschied in Bezug auf die Intensität der *Crosslinking*-Bande, als zwischen der 30 minütigen und der darauffolgenden weiteren zweistündigen Bestrahlung. Die photoreaktive Aktivierung der Diazirierunggruppe kann somit bei noch folgenden Experimenten mit ausreichender Effizienz durch eine Bestrahlungsdauer von etwa einer Stunde in einem Abstand von  $\leq 6$  cm durchgeführt werden. In Abbildung 3.30 des Ergebnisteils sind die einzelnen Schritte des *Crosslinking* von Zarvin und Cetuximab auf einem Schägger-Jagow-Gel dargestellt. Die Spuren 5 und 6 enthalten jeweils 5 µl der *Crosslinking*-Reaktionen basierend auf Ansatz 1 bzw. Ansatz 2 nach einer Bestrahlungsdauer von zwei Stunden.

### 3. Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse dieser Arbeit befassen sich mit der Charakterisierung des Proteins Zarvin für den potentiellen Einsatz als  $T_1$ -Kontrastmittel. Es wird zunächst die Herstellung des Proteins und seiner einzelnen Domänen mittels rekombinanter DNA-Technologie und bakterieller Überexpression beschrieben. Anschließend folgt eine Analyse der Faltung des Proteins auf Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturebene. Es wurde weiterhin sowohl die Intaktheit der Z-Domäne in Bezug auf die Bindung an einen IgG-Antikörper, als auch die Affinität der Parvalbumin-Domäne für  $Gd^{3+}$  überprüft. Die Relaxivität  $r_1$  von Zarvin: $(Gd^{3+})_2$  wurde mittels Relaxationsmessungen bei klinisch eingesetzten Feldstärken analysiert. Für einen potentiellen Einsatz *in vivo* wurde sowohl die thermische Stabilität der Proteinfaltung, als auch die Suszeptibilität gegenüber proteolytischem Abbau untersucht. Abschließend wurden die Interaktionen zwischen der Z-Domäne und einem IgG-Antikörper sowie zwischen der Parvalbumin-Domäne und  $Gd^{3+}$  auf kinetischer Ebene analysiert, um eine Aussage über die realistische Anwendbarkeit dieses Projektes treffen zu können.

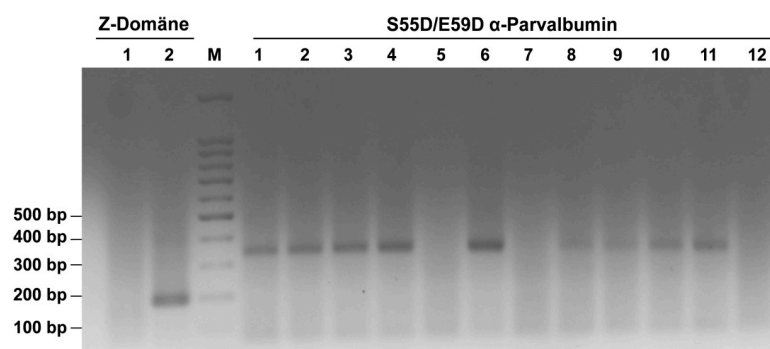
#### 3.1 Klonierung von Zarvin und dessen einzelner Domänen

Die biochemische und biophysikalische Charakterisierung des zwei Domänen umfassenden Proteins Zarvin erforderte zunächst dessen rekombinante Expression in *E. coli* sowie die anschließende Reinigung des Proteins. Für diesen Zweck wurde die Nukleotidsequenz von Zarvin synthetisiert und über die Restriktionsenzym-Schnittstellen *Apal* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET41\_Pre (siehe Abschnitt 2.5) subkloniert (Firma Geneart, Regensburg). Nach Expression befindet sich das Zarvin C-terminal eines GST-Tags sowie einer Schnittstelle für die PreScission-Protease (Abb. 3.1). Letztere wurde benutzt, um den GST-Tag nach entsprechender Affinitätsreinigung des Fusionsproteins GST-Zarvin abzuschneiden und anschließend zu entfernen. Da die PreScission-Protease beim Schneiden nicht die gesamte Schnittstelle mit entfernt, enthält das gereinigte Zarvin N-terminal zusätzlich die beiden Aminosäuren Glycin und Prolin.



**Abb. 3.1:** Schema der Klonierung des Zarvin-Gens über die Schnittstellen ApaI und BamHI in den pET41\_Pre-Vektor. Auf Aminosäureebene folgt dem sich N-terminal befindenden GST-Tag eine Erkennungssequenz für die PreScission-Protease (blau eingrahmt) und darauf das Zarvin. Die PreScission-Protease schneidet das translatierte Fusionsprotein zwischen dem Glutamin und dem Glycin der Erkennungssequenz. Das endgültig zu reinigende Zarvin-Protein enthält somit N-terminal zusätzlich die beiden Aminosäuren GP.

Für manche Experimente wurden als Vergleich zusätzlich die beiden einzelnen Domänen von Zarvin, die Z-Domäne sowie das S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin der Ratte, benötigt. Daher wurden die Nukleotidsequenzen beider Domänen mit Hilfe von zwei PCRs auf dem bereits vorhandenen DNA-Konstrukt von Zarvin (*Template*) amplifiziert und ebenfalls in den Vektor pET41\_Pre subkloniert. Für diesen Zweck enthielten die jeweiligen *Forward-Primer* an ihrem 5'-Ende die Nukleotidsequenz einer ApaI-Schnittstelle und die entsprechenden *Reverse-Primer* die Sequenz einer BamHI-Schnittstelle. Die Ligationsansätze beider Konstrukte wurden in XL10 Gold *E. coli* Zellen transformiert und die erhaltenen Klone mittels Kolonie-PCR auf das Enthalten der Nukleotidsequenzen der Z- sowie der Parvalbumin-Domäne überprüft (Abb. 3.2).

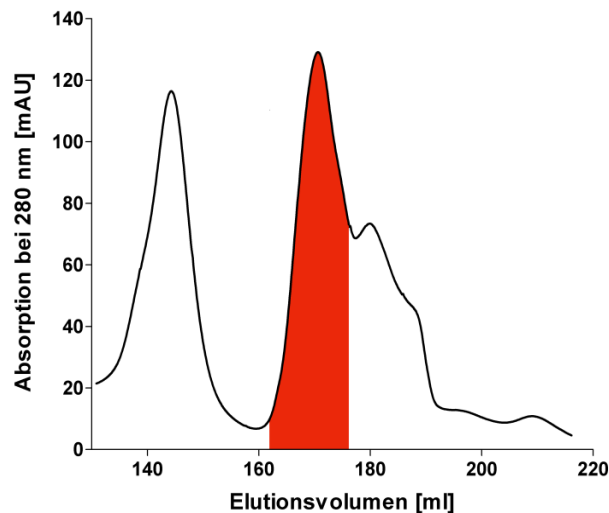


**Abb. 3.2:** Kolonie-PCR der Ligationsansätze zur Klonierung der Z- sowie der Parvalbumin-Domäne separat in den pET41\_Pre-Vektor. Für die Klonierung der Z-Domäne enthält Klon 2 ein *Insert* mit einer Basenpaarlänge in der erwarteten Größenordnung (202 bp). Für die Parvalbumin-Domäne enthalten mehrere Klone eine Basenpaarlänge mit etwa der korrekten Länge von 355 bp. M: mi-100 bp+ DNA-Marker. Klon 1 der Parvalbumin-Domäne und Klon 2 der Z-Domäne wurden sequenziert. Die Nukleotid-Sequenz beider Klone erwies sich als korrekt (Anhang A).

Das verwendete PCR-Programm und die Einzelheiten der weiteren Schritte dieser beiden Subklonierungen sind in Abschnitt 2.12 näher beschrieben. Die Alignments der Sequenzierungen mit den zu erwartenden Sequenzen befinden sich in Anhang A.

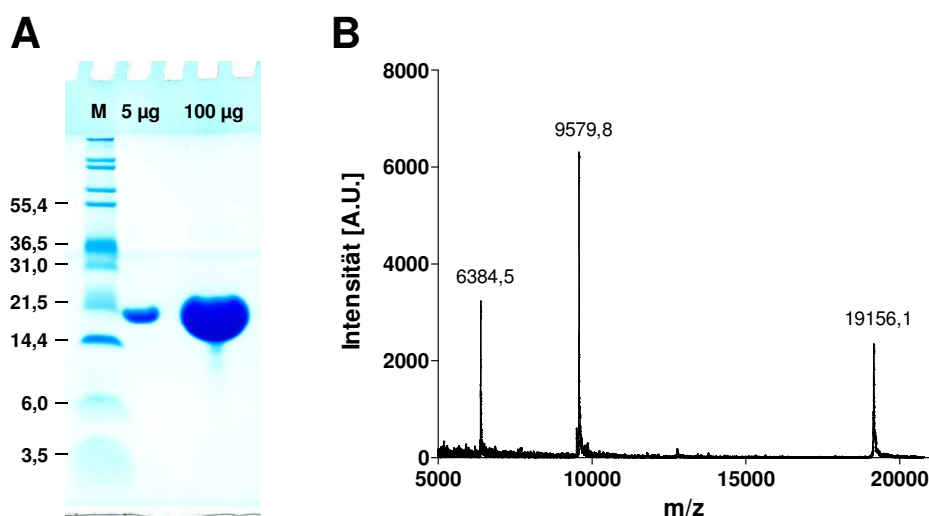
## 3.2 Expression und Reinigung von Zarvin und seiner einzelnen Domänen

Für die rekombinante Expression des in den Vektor pET41\_Pre klonierten Zarvin-Gens wurde der gegen Phagen resistente *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3)T1r gewählt. Die Expression wurde bei einer optischen Dichte der Bakteriensuspension zwischen 0,6-0,8 mit IPTG induziert. Das Fusionsprotein GST-Zarvin erwies sich als sehr gut löslich und war bei Expressionstests ausschließlich in der Überstand-Fraktion und nicht in der Pellet-Fraktion zu finden. Um die zunächst bei der Affinitätschromatographie nicht vermeidbare Mitreinigung C-terminaler Degradationsprodukte des Fusionsproteins einzuschränken wurde die Expression auf 3-6 Stunden bei einer Temperatur von 29 °C begrenzt. Diese Bedingungen erwiesen sich als ausreichend für eine hohe Proteinausbeute mit einem Anteil an Degradationsprodukten, der durch eine finale Gelfiltration gut entfernt werden konnte (Abb. 3.3). In M9 Minimalmedium zur Expression von <sup>15</sup>N-markiertem Protein wurde die Expressionsdauer allerdings auf etwa 18 Stunden erhöht. Nach dem auf die Expression folgenden Aufschluss der Zellen wurde der lösliche Überstand auf eine GSH-Säule aufgetragen. Bei diesem Schritt wurde das auf der Säule gebundene GST-Zarvin zunächst mit einem Hochsalzpuffer von unspezifisch an das Säulenmaterial gebundenen Bakterienproteinen gesäubert. Ein ATP enthaltender Puffer wurde verwendet, um an GST-Zarvin gebundene Bakterienchaperone (Hitzeschock-Protein 40 und 70) zu entfernen. Potentiell an die Parvalbumin-Domäne gebundenes, aus *E. coli* stammendes Ca<sup>2+</sup>, wurde durch Inkubation mit einem EDTA enthaltenden Puffer entfernt. Das so gesäuberte und eluierte Protein (ca. 90 mg/L Kultur) wurde mit der PreScission Protease geschnitten. Die Molekulargewichte von Zarvin (~19,2 kDa) und dem GST-Monomer (~28,0 kDa) erwiesen sich als zu dicht beieinander liegend, um die beiden Proteine anschließend durch eine Gelfiltration sauber zu trennen. Daher wurde das GST sowie ungeschnittenes GST-Zarvin zum Großteil über eine erneute Affinitätschromatographie mit einer GSH-Säule entfernt. Eine darauf folgende Gelfiltration des einkonzentrierten Durchflusses ermöglichte eine gute Auftrennung zwischen dem restlichen GST-Protein, Zarvin sowie dem Großteil der C-terminalen Abbauprodukte von Zarvin (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Gelfiltrationsprofil des Gemisches aus GST, Zarvin und der Abbauprodukte von Zarvin auf einer Superdex 75, 26/60 Gelfiltrationssäule. Fraktionen innerhalb des rot unterlegten Bereichs wurden gesammelt. Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4. mAU: milli *Absorption Units*.

Die Extinktionskoeffizienten von GST ( $\sim 43000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) und Zarvin ( $1490 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) bei 280 nm unterscheiden sich deutlich, was die in Abb. 3.3 trotz vorhergehender Affinitätschromatographie ähnlich großen Integrale der beiden Signale erklärt. Die Reinheit der zusammengeführten Fraktionen der Gelfiltration wurde mit einem Schägger-Jagow-Gel [132] überprüft (Abb. 3.4A). Selbst beim Auftragen von 100  $\mu\text{g}$  Protein sind nur sehr wenig Abbauprodukte sowie GST sichtbar. Die mittels MALDI-Massenspektrometrie überprüfte Masse der gereinigten Proteinspezies von 19156,1 Da für die einfach protonierte Masse entspricht der erwarteten Masse von 19156,3 Da mit einem Fehler von nur 10,4 ppm (Abb. 3.4B).



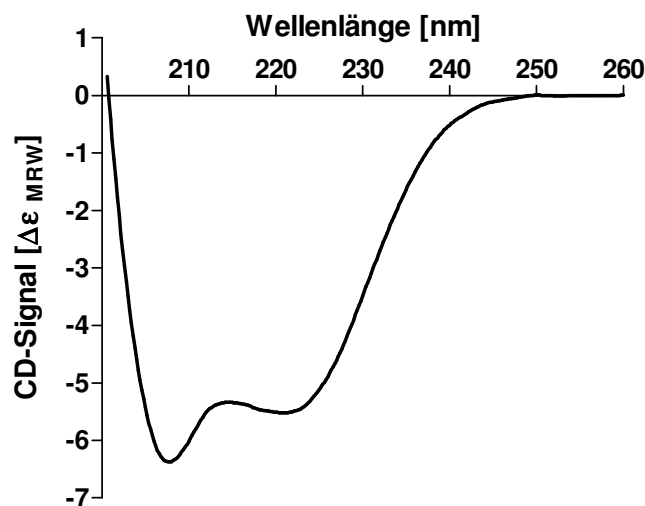
**Abb. 3.4:** **A:** Auftrag von 5 bzw. 100  $\mu\text{g}$  des gereinigten Zarvins auf ein Schägger-Jagow-Gel. M: Mark 12<sup>TM</sup> Proteinmarker mit den dargestellten Massen in kDa. **B:** MALDI-Massenspektrum von Zarvin. Sichtbar sind die einfach, zweifach und dreifach geladenen Massen des Proteins. Die erwartete einfach geladene Masse von Zarvin liegt bei 19156,3 Da (Fehler: 10,4 ppm).

Die Expression und Reinigung des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins sowie der Z-Domäne wurden analog zu Zarvin durchgeführt. Die Massenspektren des gereinigten Parvalbumins und der Z-Domäne befinden sich in Anhang B. Weitere Details der Expression und Reinigung von Zarvin sowie der einzelnen Domänen sind in den Abschnitten 2.14 und 2.15 beschrieben. Die Massenspektren der  $^{15}\text{N}$ -markiert gereinigten Proteine befinden sich ebenfalls in Anhang B.

### 3.3 Faltungseigenschaften von Zarvin

#### 3.3.1 CD-Spektroskopie

Die Faltung von Zarvin wurde zunächst auf Sekundärstrukturebene mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Dafür wurde ein Fern-UV CD-Spektrum des Proteins zwischen 200 und 260 nm aufgenommen (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Fern-UV CD-Spektrum von Zarvin. Aufgetragen ist der mittlere CD-Extinktionskoeffizient pro Aminosäure  $\Delta\epsilon_{\text{MRW}}$ . Messpuffer: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4.

Rein optisch kann an dem Spektrum bereits abgelesen werden, dass das Protein gefaltet ist und aufgrund der Minima bei etwa 208 und 222 nm einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helix aufweist. Eine genauere Analyse der Sekundärstrukturelemente wurde mittels der Programme CDSSTR, ContinLL und Selcon3 durchgeführt. Aus dem kleinsten sowie dem größten bei der Berechnung mit den drei Programmen auftretenden Prozentwert für jedes Sekundärstrukturelement wurde ein Prozentbereich in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

**Tab. 3.1:** Sekundärstrukturanteile von Zarvin

	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Turn	Unstrukturiert
<b>DSSP Vorhersage</b>	64,3 %	2,4 %	9,6 %	25,8 %
<b>CD-Spektroskopie</b>	61,8 – 64,7 %	1,4 – 3,7 %	7,1 – 12,1 %	23,7 – 24,7 %



In der Tabelle sind weiterhin die Sekundärstrukturanteile auf Basis des CD-Spektrums den vorhergesagten Werten mit Hilfe des DSSP-Algorithmus gegenübergestellt. Die Vorhersage wurde von Stefan Franke am Lehrstuhl für Bioinformatik im Jahr 2012 mit einer zuvor in der Moleküldynamik simulierten Struktur von Zarvin durchgeführt. Der Vergleich zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen Vorhersage und Messwerten. Die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Faltung von Zarvin war daher recht hoch. Um dies auf Tertiärstrukturebene zu bestätigen wurde Zarvin weiterhin noch mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht.

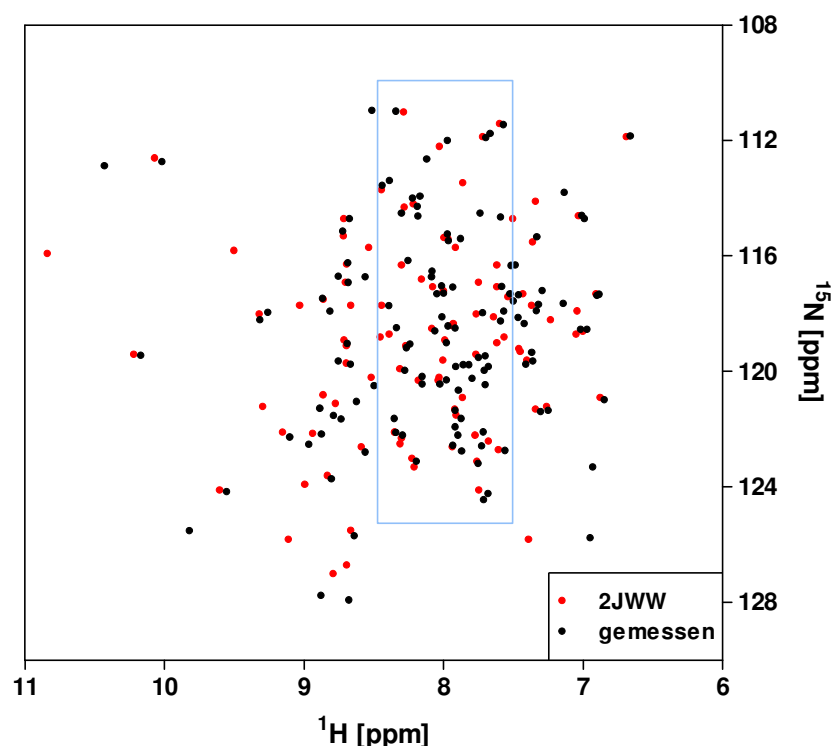
#### 3.3.2 NMR-Spektroskopie

Um zu überprüfen, ob sich die Z- und Parvalbumin-Domäne innerhalb von Zarvin korrekt falten, wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der beiden Domänen und des Zarvins herangezogen. Bei diesem 2D-NMR-Experiment werden die umgebungssensitiven chemischen Verschiebungen der NH-Kopplung der Peptidbindung sowie der Glutamin- und Asparagin-Seitenketten dargestellt. Mit Ausnahme der N-terminalen Aminosäure des untersuchten Proteins sowie von Prolinen entsteht bei diesen Spektren für jede Aminosäure ein Signal der NH-Kopplung der Peptidbindung. Die Verteilung der Signale innerhalb dieser Spektren ist charakteristisch für die Faltung und damit auch die Tertiärstruktur eines Proteins. Ein Vergleich zwischen der Signalverteilung der separat gereinigten Domänen und Zarvin müsste daher Aufschluss darüber geben, ob das Spektrum von Zarvin grob mit der Überlagerung der Spektren der einzelnen Domänen übereinstimmt. Dies würde für eine unabhängige und korrekte Faltung der Domänen innerhalb von Zarvin sprechen.

Für dieses Experiment wurden die Z-Domäne, das S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin sowie Zarvin  $^{15}\text{N}$ -markiert exprimiert und gereinigt. Zunächst wurden die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der beiden separaten Domänen in dem Puffer 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 und bei 27 °C aufgenommen. Um zu überprüfen, ob die beiden gereinigten Proteine korrekt gefaltet sind, wurden die gemessenen chemischen Verschiebungen der NH-Kopplungen mit Werten aus der „*Biological Magnetic Resonance Bank*“ (BMRB) [133] der entsprechenden NMR-Strukturen der Proteine verglichen.

Für die Z-Domäne wurde dafür die Struktur mit dem „*protein data bank*“ (pdb) [134] Eintrag 1Q2N [135] verwendet. Der Vergleich zeigt, dass die Signalverteilung der gereinigten Z-Domäne nahezu optimal mit den Literaturwerten übereinstimmt (siehe Anhang C). Leichte Abweichungen sind dadurch zu begründen, dass das Spektrum der publizierten Struktur bei einem pH-Wert von 6,5 und nur 20 mM Salz aufgenommen wurde. Für die S55D/E59D-Mutante des Ratten  $\alpha$ -Parvalbumins existiert keine NMR-, sondern nur eine Kristallstruktur (pdb-Eintrag 1S3P [98]). Daher wurde für die Überprüfung der Faltung der gereinigten

$\alpha$ -Parvalbumin-Mutante die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie NMR-Struktur des entsprechenden Wildtyp-Proteins der Ratte herangezogen (pdb-Eintrag 2JWW [136]). Abbildung 3.6 zeigt den Vergleich zwischen Mess- und Literaturdaten. Trotz der Doppelpunktmutation ist deutlich zu erkennen, dass die Verteilung der Signale gut übereinstimmt. Was allerdings auffällt ist, dass das gemessene  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins mit 140 Signalen etwa 29 zu viel aufweist. Erwartet würden maximal 108 Signale für die NH-Kopplung der Peptidbindung bei 109 Aminosäuren Sequenzlänge plus zwei Signale für die Seitenkette des Glutamins 31. Eine genauere Betrachtung des Vergleichs zwischen dem  $\alpha$ -Parvalbumin-Spektrum und dem Wildtyp-Spektrum aus der Datenbank zeigt, dass sich die Verschiebungen der überschüssigen Signale auf der  $^1\text{H}$ -Achse vor allem im Bereich zwischen etwa 7,5 und 8,5 ppm befinden. Signale in diesem Bereich bedeuten meist, dass sich die zugehörigen Aminosäuren in einem eher unstrukturierten Bereich des Proteins befinden. Da sich zwischen 7,5 und 8,5 ppm einige Signale teilweise überlappen würde ein Vergleich des Parvalbumin- und des Zarvin-Spektrums erschwert.

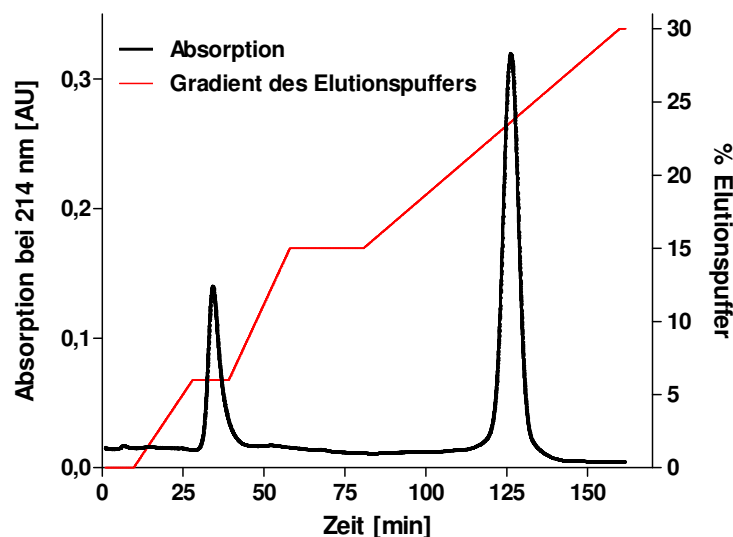


**Abb. 3.6:** Vergleich zwischen dem gemessenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins und den entsprechenden NH-Signalen des Wildtyp  $\alpha$ -Parvalbumins (pdb-ID: 2JWW). Trotz sehr ähnlicher Verteilung der Signale weist das gemessene Spektrum einen deutlichen Überschuss an Signalen innerhalb des blau eingerahmten Bereichs auf.

Der Hauptgrund für die zusätzlichen Signale ist eine partielle Destabilisierung des  $\alpha$ -Parvalbumins bedingt durch die Doppelpunktmutation in der CD-Bindestelle [98]. Die D-Helix des Proteins wird dadurch instabil, was zu einer partiellen Entfaltung führt. Das

Entstehen zusätzlicher Signale bedingt durch Restmengen an  $\text{Ca}^{2+}$  aus *E. coli* in der Probe wurde durch Anwesenheit von 1 mM EDTA während der Messungen ausgeschlossen. Restmengen an  $\text{Ca}^{2+}$  würden ebenfalls dazu führen, dass sich zwei leicht unterschiedliche Konformationen des Proteins in der Probe befinden, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie und eine Konformation mit gebundenem  $\text{Ca}^{2+}$ .

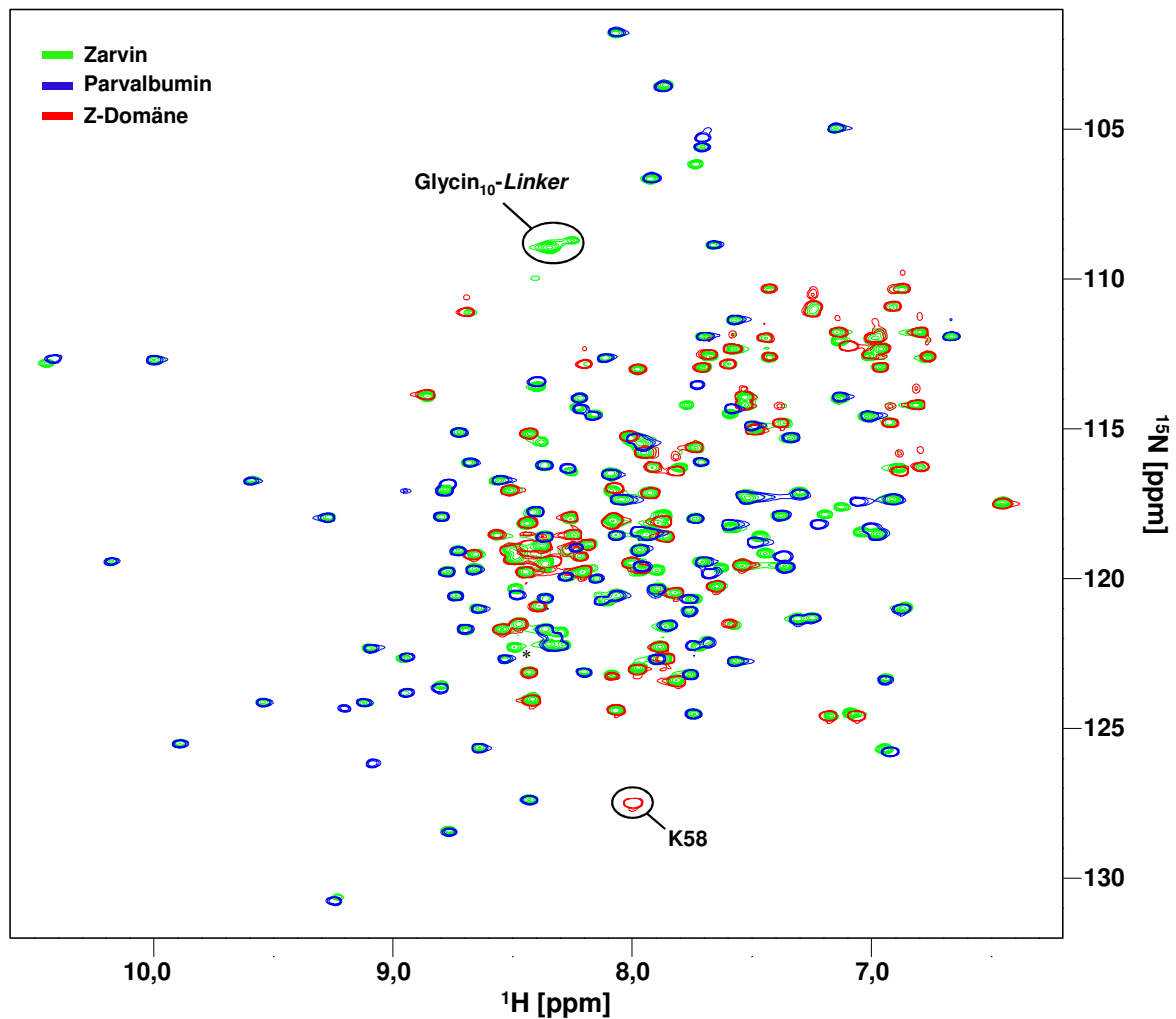
Die Vermeidung zweier Konformationen in der zu messenden Probe bedingt durch die partielle Destabilisierung des Proteins konnte auch durch eine Absenkung der Messtemperatur auf 15 °C nicht erreicht werden. Statt einer Reduktion der Signale zeigte sich im Gegenteil eine Erhöhung der Intensitäten zuvor schwacher Signale in dem Spektrum, was dafür spricht, dass die niedrigere Temperatur die Bildung der weniger eingenommenen Konformation eher noch begünstigt. Selbst bei 4 °C zeigt das S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin das Verhalten von mindestens zwei Spezies. Das Binden des Proteins an eine Q-Sepharose-Säule (Anionenaustauscher) führt bei Elution mit einem Salzgradienten zu einem Elutionsprofil mit zwei Signalen (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** Anionenaustausch-Chromatographie des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins mit Hilfe einer Q-Sepharose-Säule. Mindestens zwei verschiedene Spezies des Proteins existieren in Lösung, die mittels Anionenaustausch-Chromatographie getrennt werden können. Theoretischer isoelektrischer Punkt des Parvalbumins (entsprechend der Primärsequenz): 4,86. Auftragspuffer: 20 mM Tris, pH 8,0 (bei 4 °C). Elutionspuffer: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 (bei 4 °C).

Der Konformationswechsel zwischen diesen Spezies ist weiterhin dynamisch, was durch das erneute Auftragen von Protein aus Fraktionen des hinteren Signals mit wieder demselben Elutionsmuster nachgewiesen werden konnte. Zarvin zeigt bei diesem Experiment ein analoges Verhalten, nur zu etwas höheren Elutionszeiten hin verschoben aufgrund einer höheren Anzahl ionischer Interaktionen mit dem Säulenmaterial bedingt durch die Z-Domäne (siehe Anhang D).

Um das Problem mit der erhöhten und überlappenden Signalanzahl in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der  $\alpha$ -Parvalbumin-Mutante und des Zarvins zu lösen, wurden beide Proteine während der Messungen mit  $\text{Ca}^{2+}$  gesättigt.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der Holoform beider Proteine zeigen eine passende Anzahl an Signalen und dadurch eine geringere Überlappung der Signale zwischen 7,5 und 8,5 ppm. Abbildung 3.8 zeigt die Überlagerung der drei  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Z-Domäne,  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigtem S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin und  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigtem Zarvin.



**Abb. 3.8:** Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Zarvins (grün), des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins (blau) sowie der Z-Domäne (rot). Die Konturen der Spektren der Einzeldomänen wurden herabgesetzt, um die Überlagerung mit Signalen des Zarvins besser sichtbar zu machen. Das relativ breite Signal des Zarvins, welches kein Äquivalent in den Spektren der Einzeldomänen hat, entspricht der Überlagerung mehrerer Signale des Glycin<sub>10</sub>-Linkers. Die chemische Verschiebung der C-terminalen Aminosäure K58 der Z-Domäne ändert sich in Zarvin aufgrund des auf diese Aminosäure folgenden Glycin<sub>10</sub>-Linkers. Das wahrscheinlichste Äquivalent dieses Signals innerhalb des Zarvin-Spektrums ist mit einem Stern gekennzeichnet.

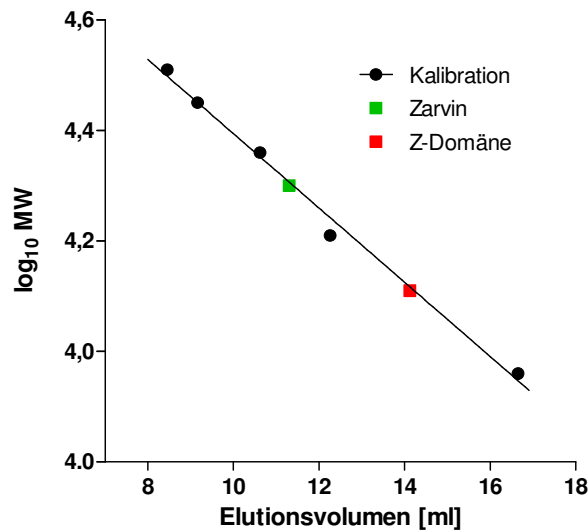
Die Signalkonturen der Spektren der separaten Domänen wurden herabgesetzt, um überlagerte Signale besser sichtbar zu machen. Es ist deutlich erkennbar, dass die große Mehrheit der Signale des Zarvins eindeutig einem Signal der separaten Z-Domäne oder

einem Signal des separaten  $\alpha$ -Parvalbumins zugeordnet werden kann bzw. die Änderungen in den chemischen Verschiebungen nur geringfügig sind. Ein prominenter Unterschied zwischen den Spektren ist das breite, auf der  $^{15}\text{N}$ -Achse relativ tieffeldverschobene Signal im Zarvin-Spektrum, welches einer Überlagerung der meisten der Glycine des Dekaglycin-*Linkers* zugeordnet werden kann. Ein weiterer deutlicher Unterschied ist das Signal des Lysins 58 der Z-Domäne. Dies ist die letzte und damit C-terminale Aminosäure der Z-Domäne, welche sich im Zarvin nun direkt N-terminal des Dekaglycin-*Linkers* befindet und wodurch sich die entsprechende chemische Verschiebung ändert. Das in Zarvin sehr wahrscheinlich Lysin 58 zuzuordnende Signal ist mit einem Stern gekennzeichnet. Um allerdings mit Sicherheit sagen zu können, welches Signal im Zarvin-Spektrum dem Lysin 58 entspricht, müsste eine teilweise Zuordnung des Proteinrückgrates mit Hilfe anderer NMR-Spektren vorgenommen werden. Der Informationsgewinn würde den Aufwand dafür allerdings nicht rechtfertigen. Zusammenfassend kann anhand der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren behauptet werden, dass sich die beiden Domänen des Zarvins unabhängig voneinander und korrekt falten. Die im BMBF-Antrag vorgesehene Berechnung einer kompletten NMR-Struktur für ein neues proteinbasiertes Kontrastmittel wurde daher als nicht notwendig erachtet.

### 3.4 Zarvin ist ein Monomer

Das sich korrekt faltende Zarvin wurde weiterhin der Analyse bezüglich einer Multimerisierung unterzogen, da letztere Konsequenzen für die Relaxationseigenschaften des Proteins bei einer *in vivo* Anwendung hätte (siehe Abschnitt 4.1). Der Test auf Multimerisierung wurde durchgeführt, da die separate Z-Domäne (~6,8 kDa) bei einer analytischen Gelfiltration in Tris-Puffer bei pH 8,0 und 150 mM NaCl eindeutig das Laufverhalten eines Trimeres mit gut 20 kDa aufweist (Abb. 3.9). Selbst bei einer Salzkonzentration von 1 M NaCl eluiert die Z-Domäne unter diesen Bedingungen mit einem Volumen, das einer trimeren Spezies entspricht. Das Elutionsverhalten von Zarvin wurde daraufhin in dem Puffer 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 getestet. Das Protein zeigt unter diesen Bedingungen das Elutionsverhalten einer Spezies mit einem Molekulargewicht von etwa 32 kDa. Dieses Molekulargewicht liegt zwar deutlich über der tatsächlichen Masse des Proteins von 19,2 kDa, ist aber von einer trimeren Spezies mit 57,5 kDa weit entfernt. Das leicht erhöhte scheinbare Molekulargewicht von Zarvin in der Gelfiltration kann durch die hantelförmige Struktur des Proteins erklärt werden. Aufgrund des Dekaglycin-*Linkers* erhält

Zarvin einen erhöhten hydrodynamischen Radius, der ein beschleunigtes Elutionsverhalten hervorruft.

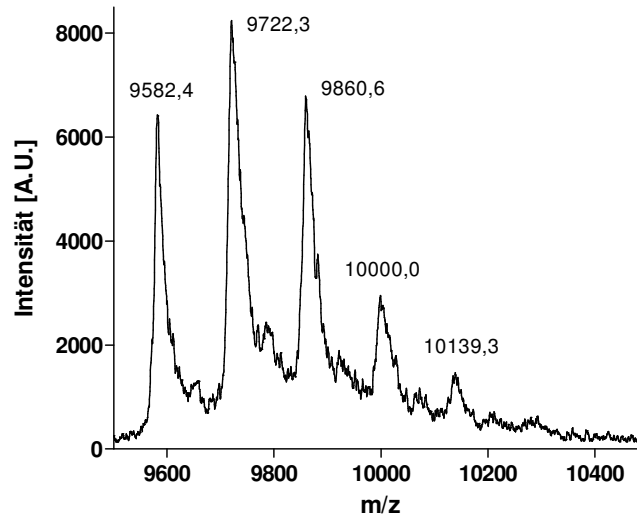


**Abb. 3.9:** Abschätzung des Molekulargewichtes von Zarvin und der Z-Domäne in Lösung mittels analytischer Gelfiltration. Aufgetragen ist der dekadische Logarithmus des Molekulargewichtes bekannter Kalibrationsproteine gegen das Elutionsvolumen der Proteine auf einer Superdex 75, 10/300 GL Gelfiltrationssäule. Das scheinbare Molekulargewicht von Zarvin und der Z-Domäne wurde mit Hilfe der Kalibrationsgerade sowie dem Elutionsvolumen der beiden Proteine bestimmt. Für Zarvin wurden etwa 32 kDa berechnet und für die Z-Domäne etwa 20 kDa (Trimer). Beide Proteine wurden der Übersichtlichkeit halber mit in die obige Graphik aufgenommen, tragen aber nicht zu der linearen Regression der Kalibrationsgerade bei ( $R^2 = 0,9928$ ). Als Kalibrationsproteine dienten die  $\alpha$ -Amylase (51 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (36 kDa), Chymotrypsinogen A (25,7 kDa) und Lysozym (14,4 kDa) (Details siehe Abschnitt 2.20). Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 (bei 4 °C).

### 3.5 Funktionalität der Z-Domäne des Zarvins

Moleküldynamik-Simulationen von Stefan Franke hatten gezeigt, dass ein Teil der  $F_c$ -bindenden Oberfläche der Z-Domäne zeitweise während der Simulation von der Parvalbumin-Domäne maskiert wird. Daher bestand der nächste Schritt bei der Charakterisierung von Zarvin darin, zu überprüfen, ob die Z-Domäne in dem zwei Domänen umfassenden Protein noch in der Lage ist an  $F_c$ -Bereiche von IgG-Antikörpern zu binden. Dies wurde in einem Titrationsexperiment mit dem therapeutischen monoklonalen IgG-Antikörper Cetuximab (anti-EGF-Rezeptor IgG, [137]) und mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie getestet. Für das Experiment wurde der kleinmolekulare Fluoreszenzfarbstoff Atto465 über eine aminreaktive NHS-Ester-Gruppe an den N-Terminus sowie an Lysinseitenketten von Zarvin gekoppelt. Die Kopplungseffizienz der Reaktion wurde mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie gemessen, indem sowohl der Farbstoff als auch das Protein nach Abtrennung von ungebundenem Farbstoff quantifiziert wurden (siehe Abschnitt 2.22.1). Mit einem Wert von etwa 32 % ist die entsprechende Effizienz zwar nicht

optimal, aber ausreichend für ein Titrationsexperiment, bei dem die Fluoreszenzanisotropie des Farbstoffes beobachtet wird, da die Änderung der Letzteren unabhängig von der Färbefizienz ist. Abbildung 3.10 zeigt ein MALDI-Massenspektrum des Zarvin-Atto465. Vergrößert dargestellt sind die zweifach positiv geladenen Massen der Proteinlösung.

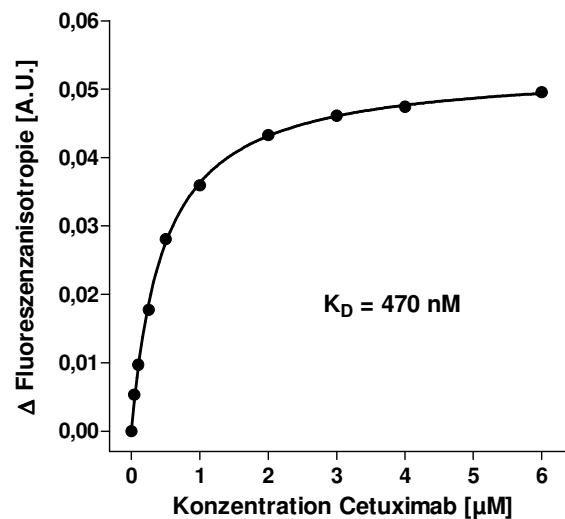


**Abb. 3.10:** MALDI-Massenspektrum des gereinigten Kopplungsansatzes zur Herstellung von Zarvin-Atto465. Dargestellt sind die zweifach positiv geladenen Massen des Ansatzes. Die erwartete zweifach positiv geladene Masse des Proteins ohne Farbstoff liegt bei 9579,7 Da, was der Masse von 9582,4 Da entspricht. Die halbe Masse des Farbstoffes Atto465 (ohne die NHS-Gruppe) liegt bei 138,95 Da, was ebenfalls im Rahmen des Fehlers der jeweiligen Verschiebung zwischen den einzelnen Signalen entspricht. Neben dem Protein ohne gekoppelten Farbstoff befinden sich in dem Ansatz demnach v. a. Spezies mit ein bis vier gekoppelten Farbstoffmolekülen.

Es ist erkennbar, dass sich neben dem Protein ohne gekoppelten Farbstoff v. a. Proteinspezies mit einem, zwei, drei und zu einem geringen Anteil auch vier gekoppelten Farbstoffmolekülen in der Lösung befinden. Wie erwartet wurden daher auch Farbstoffmoleküle an  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppen von Lysinen gekoppelt. Zarvin enthält insgesamt 22 Lysine, von denen sich eines an der Oberfläche für die F<sub>c</sub>-Bindung von Antikörpern befindet (K35) und 16 innerhalb der Parvalbumin-Domäne. Die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppen aller 22 Lysine sind mehr oder weniger zugänglich für das Lösungsmittel (Berechnung mit dem DSSP-Algorithmus). Der statistische Anteil an nicht F<sub>c</sub>-bindenden Zarvin-Spezies mit an K35 gebundenem Farbstoff ist damit als eher gering einzuschätzen. Eine höhere Kopplungseffizienz hätte mit einer höheren Farbstoffkonzentration während der Reaktion oder einem höheren pH-Wert erreicht werden können. Beides hätte allerdings auch zur Folge gehabt, dass ein höherer Anteil Farbstoffmoleküle an Lysine gekoppelt wird. Damit würde sich entsprechend auch der Anteil nicht F<sub>c</sub>-bindender Spezies erhöhen. Zudem wurde Zarvin-Atto465 bei der folgenden Titration vorgelegt und Bindungsaffinitäten sind entsprechend dem Massenwirkungsgesetz unabhängig von der Konzentration der

vorgelegten Substanz. Eine höhere Kopplungseffizienz würde sich lediglich auf die Fluoreszenzintensität bei der Messung der Fluoreszenzanisotropie und damit auf das Signal-Rausch-Verhältnis auswirken. Die verwendete Methode der verhältnismäßig schnellen aminreaktiven Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes ist daher ausreichend für eine qualitative Überprüfung der Bindung von Zarvin an einen Antikörper.

In Abb. 3.11 ist die Titrationskurve von ca. 120 nM Zarvin der Zarvin-Atto465-Lösung mit Cetuximab dargestellt. Die Fluoreszenzanisotropie von Atto465 wurde im Zuge der Titration mit dem Antikörper gemessen. Die Zunahme des Signals entspricht dabei einer sukzessiven Bindung des Zarvin-Atto465 an Cetuximab. Die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes verlangsamt sich durch die Bindung an den verhältnismäßig großen Antikörper, wodurch die entsprechende Fluoreszenzanisotropie des Farbstoffes zunimmt.



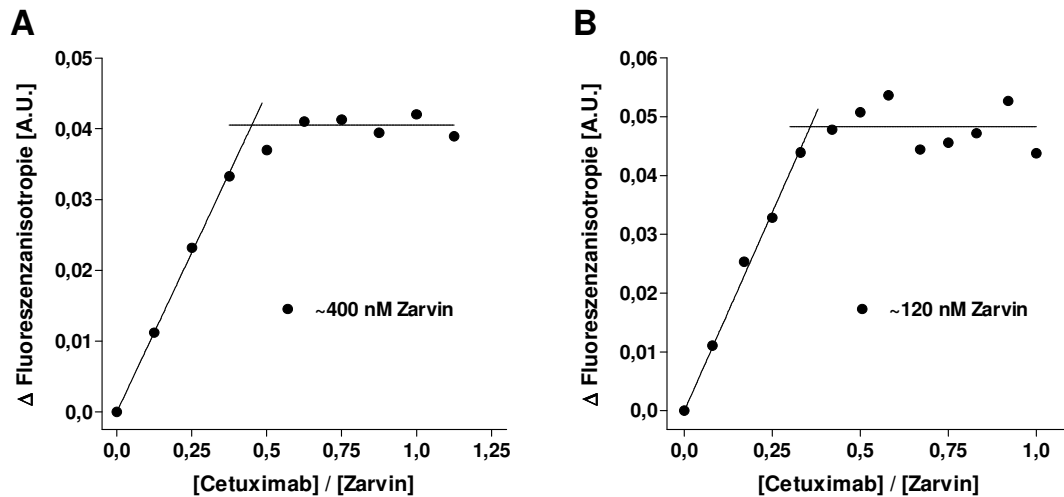
**Abb. 3.11:** Titration von ca. 120 nM Zarvin der Zarvin-Atto465-Lösung (Kopplungseffizienz des Atto465: ~32 %) mit Cetuximab. Die Fluoreszenzanisotropie des Fluoreszenzfarbstoffes Atto465 wurde im Zuge der Titration gemessen. Dargestellt ist die Änderung  $\Delta$  der Fluoreszenzanisotropie der Titrationsschritte gegenüber der Anisotropie des Farbstoffes in Abwesenheit von Cetuximab. Eine hyperbole Gleichung wurde mittels nichtlinearer Regression in die Datenpunkte eingepasst ( $R^2 = 0,9992$ ), um den  $K_D$ -Wert der Bindung zu berechnen. Messpuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Eine hyperbole Bindungskurve kann sehr gut mittels nichtlinearer Regression in die Datenpunkte eingepasst werden, was qualitativ ein Beweis für die Funktionalität der Z-Domäne innerhalb des Proteins Zarvin ist. Der hier gemessene  $K_D$ -Wert von etwa 470 nM für die Bindung liegt allerdings eine gute Größenordnung über Literaturwerten für die Bindung der Z-Domäne an  $F_c$ -Bereiche von Antikörpern [138–141]. Daher wurde im Weiteren noch überprüft, ob diese verringerte Affinität im Vergleich zu Literaturwerten durch die Färbetechnik oder durch die Interaktion der beiden Domänen des Zarvins verursacht wird. Eine simple Kompetitionstitration mit ungefärbtem Zarvin würde hier



keinen echten  $K_D$ -Wert für letztere Spezies liefern, da dafür der reine  $K_D$ -Wert des Zarvin-Atto465 bekannt sein müsste. Aufgrund der Färbefeffizienz von 32 % liegt dort allerdings bereits eine Kompetition mit ungefärbtem Zarvin vor, sodass der  $K_D$ -Wert von 470 nM nicht für die reine Zarvin-Atto465 Spezies gilt und nur qualitativ ein Beweis für die Bindung ist. Auch eine Färbefeffizienz von 100 % würde bei der aminreaktiven Färbetechnik nicht bedeuten, dass 100 % der Zarvinmoleküle einen Farbstoff tragen. Aus diesem Grund wurde mittels *Quik-Change* eine Mutante von Zarvin generiert (S146C), bei der ein Cystein innerhalb der Parvalbumin-Domäne eingefügt wurde (siehe Anhang E). Die Mutante wurde analog zu Zarvin exprimiert und gereinigt (mit zusätzlich 1 mM DTT in den Reinigungspuffern) und konnte genutzt werden, um einen thiolreaktiven Farbstoff an das Cystein zu koppeln ohne dabei eine Bindung der Z-Domäne an einen Antikörper zu behindern. Da die Parvalbumin-Domäne über den flexiblen Dekaglycin-*Linker* von der Z-Domäne getrennt ist, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 1,5-IAEDANS für das Experiment verwendet. Dieser Farbstoff hat eine lange Fluoreszenzlebenszeit zwischen 10 und 15 ns und kann dadurch mittels Fluoreszenzanisotropie auch Bindungen sichtbar machen, bei denen sich die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffes nur geringfügig ändert, wenn ein weiteres Molekül (hier der Antikörper) an das Protein mit dem gekoppelten Farbstoff bindet. 1,5-IAEDANS wurde mit Hilfe einer Iodacetamid-Gruppe an das Cystein von Zarvin-S146C gekoppelt. Dabei erwies sich dieses Cystein als nicht gut genug zugänglich für das Lösungsmittel, wodurch eine Kopplungseffizienz von nur etwa 6 % erreicht wurde. Analog zu der obigen Betrachtungsweise von Zarvin-Atto465 war diese Effizienz allerdings ausreichend für das folgende Experiment. Das Zarvin mit etwa 6 % gekoppelten Farbstoffmolekülen wurde dafür mit einer Konzentration von einmal 400 nM bzw. einmal mit einer Konzentration am Detektionslimit von 120 nM vorgelegt und mit Cetuximab titriert (Abb. 3.12).

Beide Kurven zeigen die Form einer *Active-Site Titration*, was qualitativ ein Beweis dafür ist, dass die Bindungsaffinität von Cetuximab und Zarvin deutlich unterhalb von 100 nM liegt (wahrscheinlich sogar unterhalb von 60 nM wegen der Bindungsstöchiometrie von zwei an einen Antikörper bindenden Zarvin-Molekülen). Aufgrund der Stöchiometrie von zwei Zarvin-Molekülen, die an einen IgG-Antikörper binden, wird eine Sättigung bei einem Konzentrationsverhältnis von Cetuximab zu Zarvin von 0,5 erwartet.



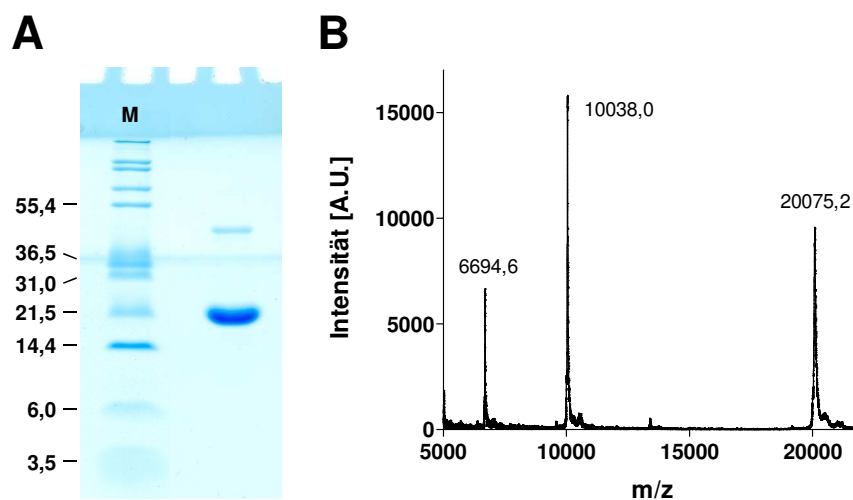
**Abb. 3.12:** Titration von 400 nM bzw. 120 nM Zarvin-S146C (Kopplungseffizienzen mit 1,5-IAEDANS: ~5 %) mit Cetuximab. Die Fluoreszenzanisotropie des Farbstoffes 1,5-IAEDANS wurde im Zuge der Titration gemessen. Dargestellt ist die Änderung  $\Delta$  der Fluoreszenzanisotropie der Titrationsschritte gegenüber der Anisotropie des Farbstoffes in Abwesenheit von Cetuximab. Beide Kurven haben die Form einer *Active-Site Titration*, bei der die Sättigung grob (im Rahmen des Fehlers) bei einem Konzentrationsverhältnis von Cetuximab zu Zarvin von 1:2 eintritt. Messpuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Bei den Titrationsen liegt die Sättigung leicht unterhalb von 0,5, was an der nicht mehr so exakt bestimmbaren Konzentration des Zarvins nach der Kopplung von 1,5-IAEDANS liegt sowie besonders bei der 120 nM-Kurve an der Messung am Detektionslimit und damit einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis. Qualitativ kann jedoch argumentiert werden, dass die Affinität der Bindung von Zarvin an Cetuximab deutlich unterhalb 100 nM liegt und daher nicht nennenswert von den oben erwähnten Literaturwerten abweicht. Der erhöhte  $K_D$ -Wert der Bindung von Zarvin-Atto465 ist somit auf die Färbetechnik zurückzuführen, bei welcher offensichtlich die gekoppelten Atto465-Moleküle die Bindung von Zarvin an Cetuximab beeinträchtigen. Diese Titration zeigt allerdings aufgrund guter Signal-Rausch-Verhältnisse sowie einer nahezu perfekten Hyperbolitität qualitativ sehr eindeutig die Funktionalität der Z-Domäne des Zarvins und wurde daher hier mit aufgenommen.

### 3.6 Funktionalität des Komplexes bestehend aus Zarvin und einem IgG-Antikörper

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Zarvin in der Lage ist über die Z-Domäne an den  $F_c$ -Bereich von IgG-Antikörpern zu binden, wurde dieser Komplex im Weiteren auf seine Fähigkeit getestet, an Zellen zu binden. Für dieses Experiment wurde zunächst mittels *Quik-Change* eine weitere Cystein-Mutante (D72C) von Zarvin generiert, bei welcher eine bessere Lösungsmittelzugänglichkeit des Cysteins zu erwarten war. Das Cystein befindet sich im

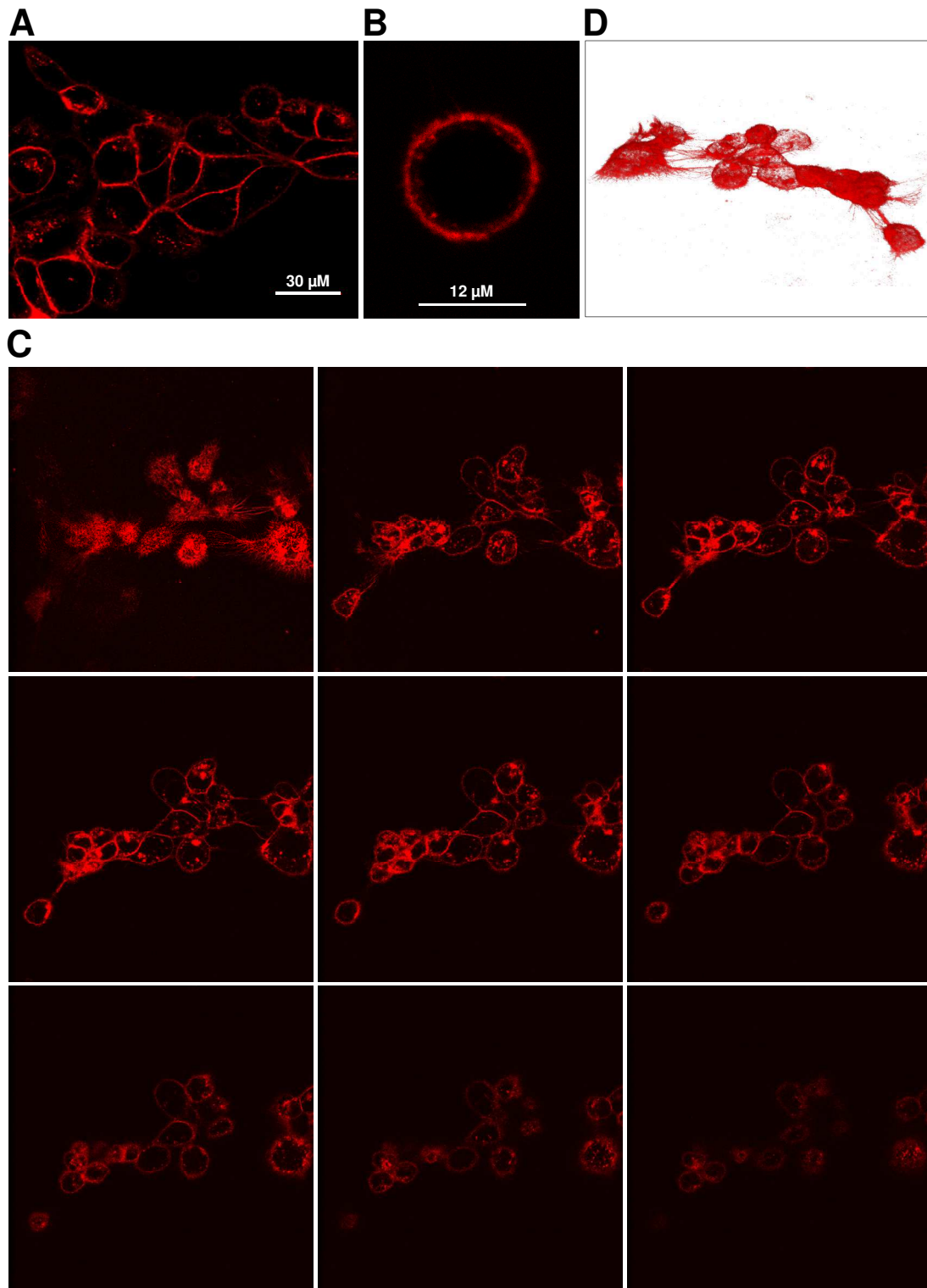
N-terminalen Bereich der Parvalbumin-Domäne, welcher sich an den Dekaglycin-*Linker* anschließt (siehe Anhang E). Die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes sollte daher auch in diesem Fall die Bindung der Z-Domäne an einen Antikörper nicht behindern. Für das Zellkultur-Experiment wurde der gut wasserlösliche rote Fluoreszenzfarbstoff Atto594 gewählt und mit Hilfe einer thiolreaktiven Maleimid-Gruppe an das Cystein von Zarvin-D72C gekoppelt. Die Effizienz der Kopplung wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie quantifiziert und betrug etwa 91 %. Dieser hohe Wert konnte durch Auftragen eines Teils des von ungebundenem Farbstoff befreiten Ansatzes auf ein Schägger-Jagow-Gel [132] bestätigt werden (Abb. 3.13A). Dem Aliquot wurde vor dem Auftragen auf das Gel genügend Zeit gegeben, sodass der Proteinanteil ohne gekoppelten Farbstoff über das Cystein dimerisieren konnte. Das Gel zeigt eine verhältnismäßig kleine Dimer-Bande und damit eine hohe Kopplungseffizienz. Abbildung 3.13B stellt das MALDI-Massenspektrum des entsprechenden Ansatzes dar. Die exakter detektierbare zweifach protonierte Masse ergibt hochgerechnet ein Molekulargewicht von 20074,0 Da für die Hauptspezies in der Lösung (ohne 2 H<sup>+</sup>), was der erwarteten Masse für Zarvin-D72C-Atto594 von 20071,3 Da (ohne H<sup>+</sup>) gut entspricht.



**Abb. 3.13:** **A:** Schägger-Jagow-Gel des gereinigten Zarvin-D72C-Atto594 Ansatzes (~9 µg) nach Inkubation des Proteins für mehrere Stunden bei Raumtemperatur. Die nur schwache Dimerbande (Disulfidbrücke) bestätigt eine hohe Kopplungseffizienz von Atto594. **B:** MALDI-Massenspektrum des Ansatzes. Dargestellt sind die ein-, zwei- und dreifach protonierten Massen. Erwartete einfach protonierte Masse von Zarvin-D72C-Atto594: 20072,3 Da (Fehler: 84,7 ppm). Die zweifach protonierte Masse der ungefärbten Dimerspezies (19143,3 Da) konnte nicht detektiert werden.

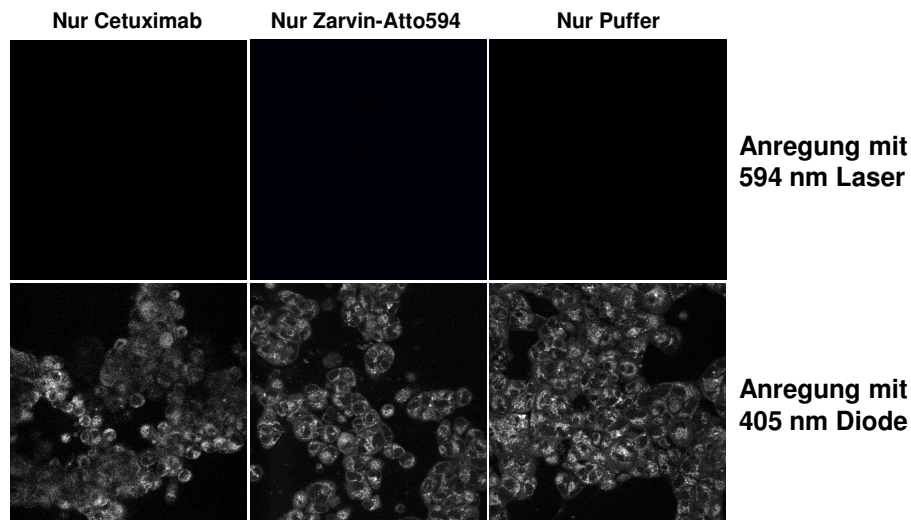
Die fluoreszenzmarkierte D72C-Mutante von Zarvin konnte nun verwendet werden, um die Bindung des Komplexes mit einem IgG-Antikörper an Zellen zu testen. Für diesen Zweck wurde ebenfalls der anti-EGF-Rezeptor (EGF: *Epidermal Growth Factor*) IgG-Antikörper Cetuximab sowie die Tumorzelllinie A431 [104] verwendet. Letztere überexprimiert den EGF-Rezeptor, welcher sich v. a. in der Zellmembran befindet. Der Komplex Cetuximab:Zarvin-

D72C-Atto594 sollte demnach in der Lage sein, die Zellränder der A431-Zellen zu färben. Die Zellen wurden dafür auf eine Dichte von  $10^5$ - $10^6$ /cm<sup>2</sup> wachsen gelassen und mit einem Gemisch aus ca. 7,8  $\mu$ M Cetuximab und ca. 14  $\mu$ M Zarvin-D72C-Atto594 über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, pH 7,4 inkubiert. In diesem Puffer waren die Zellen selbst bei Raumtemperatur über mehrere Tage vital. Nach mehreren Waschschritten wurden die Zellen lebend (keine Fixierung) mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes untersucht, wobei die Fluoreszenzemission von Atto594 nach Anregung mit einem 594 nm Laser in einem Bereich von 605-750 nm detektiert wurde (siehe Abschnitt 2.24 für Details). Abbildung 3.14A und B zeigen einen Zellverband und eine einzelne A431-Zelle. Es ist erkennbar, dass die rote Fluoreszenz des Farbstoffes überwiegend an den Zellrändern lokalisiert ist. Um diese Aussage auf den Großteil der Zellvolumina ausweiten zu können wurden zudem Schichtaufnahmen entlang der Z-Achse von Zellkolonien gemacht. In Abb. 3.14C sind mehrere Schichten einer Kolonie im Abstand von jeweils 2,34  $\mu$ M dargestellt. Weiterhin konnten mit fortschreitender Dauer der Mikroskopie zunehmend punktförmige Ansammlungen des Farbstoffes innerhalb der Zellen detektiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass membranständige EGF-Rezeptoren nach einiger Zeit wieder von den Zellen internalisiert werden [142]. Der an den EGF-Rezeptor gebundene Komplex aus Cetuximab und Zarvin-D72C-Atto594 wird dementsprechend mit zunehmender Zeit in die Zellen aufgenommen.



**Abb. 3.14:** Konfokalmikroskopie der Bindung des Komplexes Cetuximab:Zarvin-D72C-Atto594 an A431-Zellen. **A:** Schnitt durch einen Zellverband. Die Zellen haften auf dem Boden des Kulturgefäßes. **B:** Nahaufnahme eines Schnittes durch eine einzelne schwimmende Zelle. **C:** Schichtaufnahmen eines Zellverbandes entlang der Z-Achse mit einem Abstand von  $2,34\ \mu\text{M}$  zwischen zwei dargestellten Schichten. Die Bilder zeigen von links nach rechts und von oben nach unten den Verlauf der Schichten ausgehend vom Boden der Zellen (auf dem Kulturgefäß haftend). In einigen Schichten sind Einschlüsse in Form von internalisierten EGF-Rezeptoren mit dem daran gebundenen Komplex sichtbar. **D:** Aufsicht auf eine Stapelung von 124 Schichten des Zellverbandes aus Bild C mit jeweils  $0,26\ \mu\text{M}$  Abstand zwischen zwei Schichten.

Die Kontrollen zu diesen zellbasierten Experimenten sind in Abb. 3.15 dargestellt. Sie bestätigen, dass weder der Cetuximab-Antikörper noch das Zarvin-D72C-Atto594 alleine die beobachtete rote Fluoreszenz nach Inkubation mit den A431-Zellen und den anschließenden Waschschritten erzeugen. Die durchgeführten Experimente zeigen demnach, dass der Komplex aus Zarvin und Cetuximab *in vitro* funktional ist.



**Abb. 3.15:** Kontrollen des zellbasierten Experimentes zur Überprüfung der Funktionalität des Komplexes Cetuximab:Zarvin-D72C-Atto594. Es ist erkennbar, dass nach entsprechenden Waschschritten keinerlei rote Fluoreszenz an den A431-Zellen sichtbar ist, wenn eine Komponente des Komplexes oder der gesamte Komplex fehlt (obere Reihe). Die Anwesenheit von Zellen an der jeweils mikroskopierte Stelle wurde durch deren Autofluoreszenz nach Anregung bei 405 nm bestätigt. Die eigentlich blau erscheinende Autofluoreszenz wurde hier zugunsten eines besseren Kontrastes weiß dargestellt. Die in Abb. 3.13 sichtbare rote Fluoreszenz ist somit spezifisch für die Bindung des gesamten Komplexes Cetuximab:Zarvin-D72C-Atto594 an A431-Zellen.

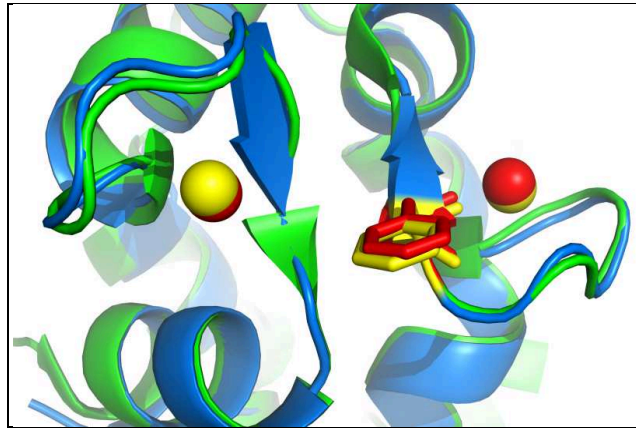
## 3.7 Affinität der Parvalbumin-Domäne des Zarvins für Lanthanoide

### 3.7.1 Etablierung eines Terbiumlumineszenz-Systems

Für die Funktion von Zarvin als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie ist es wichtig, dass das Protein einen thermodynamisch stabilen Komplex mit dreiwertigem Gadolinium bildet. Daher wurde zunächst die Affinität der Parvalbumin-Domäne für Gadolinium(III) überprüft. Diese Bindung wurde nicht direkt gemessen, da  $Gd^{3+}$  weder in der NMR- noch in der UV-Vis- oder Fluoreszenz-Spektroskopie ein gut verwertbares Signal für eine Titration liefert. Im Gegensatz dazu sind die dreiwertigen Lanthanoidionen Europium(III) und Terbium(III) anregbar und lumineszieren im sichtbaren Lichtbereich [126]. Die lumineszierenden Eigenschaften werden nach Bindung durch einen Liganden wie das Parvalbumin verstärkt (Ligandenfeld-Effekt), was für eine entsprechende Titration genutzt

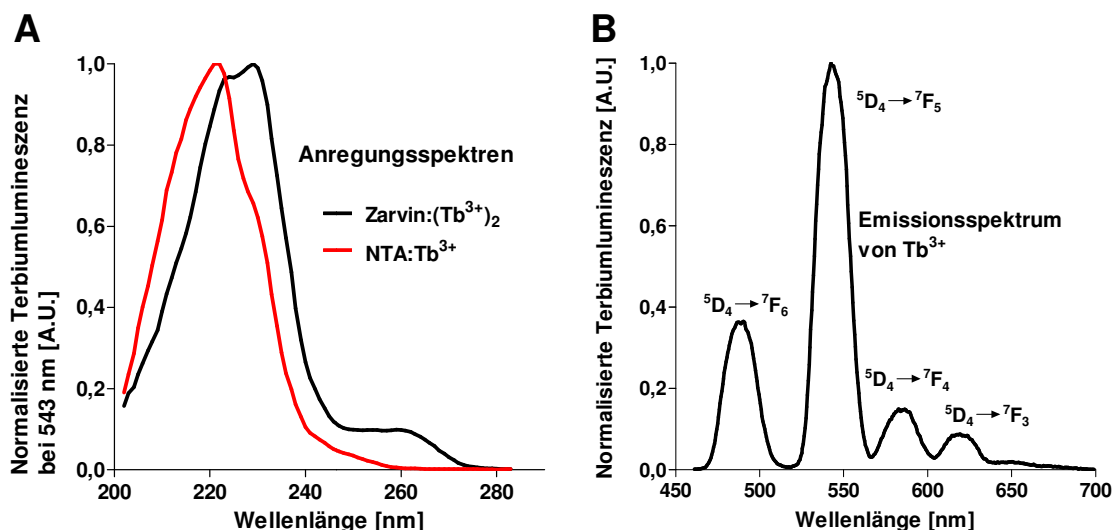
werden kann. Nach Bestimmung der Bindungsaffinität der Parvalbumin-Domäne von Zarvin für ein lumineszierendes Lanthanoid konnte die Bindungsaffinität für Gadolinium(III) in einem Kompetitionsexperiment gemessen werden. Als lumineszierendes Lanthanoid wurde für die Experimente Terbium(III) gewählt. Wenn Terbium(III) von einem Ligandenfeld, also einem Chelator oder Metallionen bindenden Protein, komplexiert wird, spalten die Terme der Mehrelektronenzustände des Ions auf (siehe Abschnitt 2.25.1 für Details). Dadurch wird eine deutlich effizientere Anregung von Elektronen in den  $^5D_4$ -Unterterm mit Hilfe von Licht im UV-Vis-Bereich ermöglicht. Die Anregung von Terbium(III) kann entweder direkt mittels eines Lasers (z. B. 488 nm) erfolgen oder indirekt über einen Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) [143]. Da ein entsprechender Laser nicht zur Verfügung stand, wurde hier die indirekte Anregung gewählt. Als Donor-Fluorophore bieten sich dabei in der Proteinbiochemie v. a. die intrinsischen Fluorophore Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin an. Ein funktionierender FRET-Mechanismus über diese Aminosäuren konnte für zahlreiche Proteine nachgewiesen werden [144]. Auch eine Parvalbumin-Spezies aus dem Muskel des Karpfens wurde bereits 1974 hinsichtlich der Bindung von  $Tb^{3+}$  mittels eines FRET-Mechanismus über ein Phenylalanin untersucht [145]. Letzteres befindet sich zwischen der CD- und der EF-Bindestelle für Metallionen an Position 57 in dem Fisch-Parvalbumin und ist bis zu höheren Säugetieren konserviert. Abbildung 3.16 zeigt ein Struktur-*Alignment* zwischen dem Parvalbumin aus dem Karpfen (pdb-ID 5CPV [146]) und der S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin Mutante der Ratte. Die Ausrichtung des Phenylalanins 57 im Verhältnis zu den gebundenen  $Ca^{2+}$ -Ionen ist in beiden Kristallstrukturen nahezu identisch und sollte aufgrund seiner Nähe auch in dem S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin einen FRET zu Terbium(III)-Ionen in beiden Bindetaschen erlauben.

Angeregtes  $Tb^{3+}$  emittiert Licht im grünen bis orangefarbenen Lichtbereich, wobei einzelne Signale im Emissionsspektrum bestimmten Übergängen vom  $^5D_4$ -Unterterm zu Untertermen des Grundterms  $^7F$  zugeordnet werden können (siehe Abschnitt 2.25.1). In Abb. 3.17 sind ein entsprechendes Anregungs- und Emissionsspektrum von Terbium(III) dargestellt, welches von den CD- und EF-Bindestellen des Zarvins komplexiert wird.



**Abb. 3.16:** Struktur-Alignment zwischen der S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin-Mutante aus der Ratte (pdb-ID: 1S3P, grün) und einer Parvalbumin-Spezies aus dem Muskel des Karpfens (pdb-ID: 5CPV, blau). Die EF- (links) und die CD-Bindestellen (rechts) beider Proteine sind mit gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dargestellt (rot: 1S3P, gelb: 5CPV). Das konservierte Phenylalanin 57 beider Strukturen ist ebenfalls dargestellt, welches bei Experimenten mit dem Parvalbumin des Karpfens dazu genutzt werden konnte, sich in den Bindestellen befindendes  $\text{Tb}^{3+}$  indirekt über einen FRET-Mechanismus anzuregen [145]. Aufgrund der hohen Strukturidentität der beiden Proteine wurde hier davon ausgegangen, dass dieser experimentelle Ansatz ebenso mit der S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin-Domäne des Zarvins funktionieren muss.

Das Emissionsspektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge von 258 nm aufgenommen, entsprechend dem Anregungsmaximum des Phenylalanins. Das Anregungsspektrum wurde mit einer Emissionswellenlänge von 543 nm aufgenommen, entsprechend dem Übergang mit der höchsten Intensität zwischen den Untertermen  $^5\text{D}_4$  und  $^7\text{F}_5$  des  $\text{Tb}^{3+}$ .

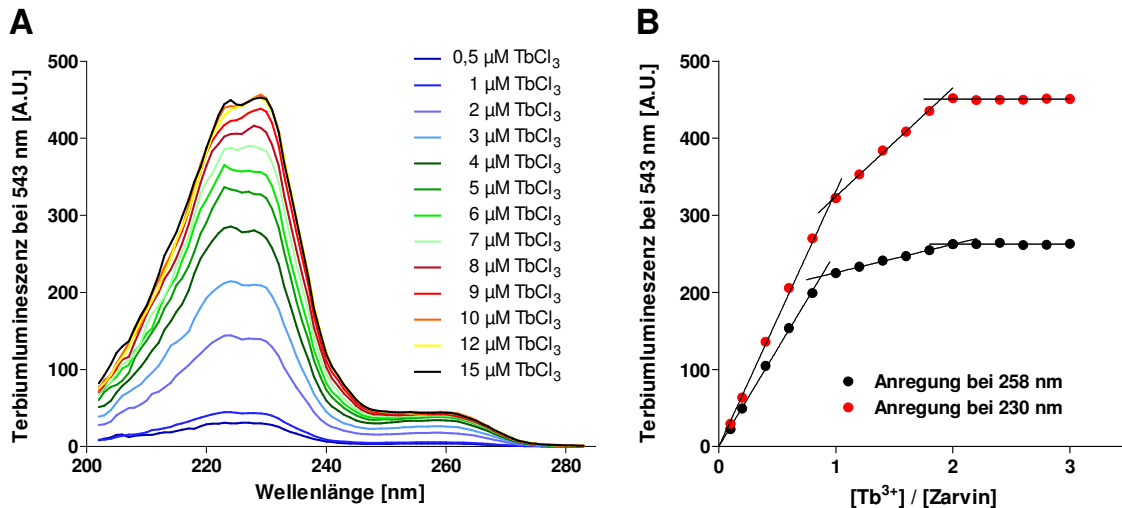


**Abb. 3.17:** **A:** Anregungsspektren von Terbium(III), welches von Zarvin bzw. NTA komplexiert wird. Die Emissionswellenlänge von 543 nm entspricht dem Maximum des Überganges von in den  $^5\text{D}_4$ -Unterterm angeregten  $\text{Tb}^{3+}$  zu dem  $^7\text{F}_5$ -Unterterm (**B**). Das Emissionsspektrum von  $\text{Tb}^{3+}$  ist im Gegensatz zu dessen Anregungsspektrum unabhängig von dem komplexierenden Ligandenfeld. Hier wurde es nach Komplexierung durch Zarvin mit einer Anregungswellenlänge von 258 nm aufgenommen.



Das Anregungsspektrum zeigt, dass das  $\text{Tb}^{3+}$  neben einem FRET über das Phenylalanin weiterhin auch mit einem FRET über Maxima in einem Bereich zwischen 220-240 nm angeregt werden kann, wobei die Anregung über diese Wellenlängen noch deutlich effizienter ist. Der entsprechende Donor, der in diesem Bereich absorbiert, sind wahrscheinlich die Carboxylgruppen der komplexierenden Aspartat- und Glutamat-Seitenketten in den beiden Bindetaschen oder auch Carbonylgruppen des Proteinerückgrates (welche in diesem Bereich absorbieren). Das Anregungsspektrum des Komplexes aus dem Chelator Nitrilotriacetat (NTA) und Terbium(III) zeigt ähnliche Anregungsmaxima bei einer Komplexbildung des Metallions durch drei Carboxylgruppen (Abb. 3.17). Daher liegt eine Beteiligung von Carboxylgruppen der komplexierenden Seitenketten im Falle des Parvalbumins bzw. Zarvins nahe. Dies könnte auch die höhere Anregungseffizienz des  $\text{Tb}^{3+}$  durch diese Wellenlängen im Vergleich zu dem Phenylalanin erklären, da die Carboxylgruppen eine deutlich kürzere Distanz zu den gebundenen Terbium(III)-Ionen aufweisen und die Effizienz eines FRET proportional zu  $1/r^6$  ist mit  $r$  als Distanz zwischen Donor und Akzeptor in Å.

Um das Terbiumlumineszenz-System mit Zarvin vor einer Affinitätsbestimmung zu testen wurde eine *Active-Site Titration* durchgeführt. Dafür wurde Zarvin mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  vorgelegt und mit Terbium(III)chlorid titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurden sowohl Anregungsspektren der Terbium(III)-Lumineszenz mit einer Emissionswellenlänge von 543 nm aufgenommen (Abb. 3.18A), als auch exakter die Lumineszenzintensität bei 543 nm nach Anregung bei 230 und 258 nm (Abb. 3.18B). Es ist erkennbar, dass die gesamten Anregungsspektren bei etwa 10  $\mu\text{M}$  einen Sättigungswert erreichen, was der Stöchiometrie von zwei gebundenen Terbium(III)-Ionen pro Zarvin entspricht. Das Auftragen der Lumineszenzintensitäten nach Anregung bei 230 und 258 nm gegen das Konzentrationsverhältnis von Terbium(III) und Zarvin verdeutlicht auch den ersten Knick der Titration bei einem Verhältnis von 1:1. Unter der Annahme, dass  $\text{Tb}^{3+}$  analog zu  $\text{Ca}^{2+}$  affiner an die EF-Bindestelle der S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin-Domäne von Zarvin bindet (Faktor 6,5 bei  $\text{Ca}^{2+}$  [98]), zeigt die *Active-Site Titration* die sequenzielle Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  zunächst an die EF- und danach an die CD-Bindestelle. Nach Anregung bei 230 nm zeigt die Titrationskurve einen stärkeren Knick bei einem Konzentrationsverhältnis von Terbium(III)/Zarvin von 1:1, als bei Anregung mit 258 nm. Die Effizienz des FRET von dem Phenylalanin auf das  $\text{Tb}^{3+}$  der CD-Bindestelle ist demnach geringer, als auf das  $\text{Tb}^{3+}$  der EF-Bindestelle. Dies wurde bei Titrationen mit Wildtyp-Parvalbuminen aus Fischen nicht beobachtet [143,145]. Dort wurde nach Anregung bei 259 nm eine gleichmäßige Steigung der Lumineszenzintensität bis zu einer Sättigung des Proteins mit zwei  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen gemessen.



**Abb. 3.18:** *Active-Site Titration* von Zarvin mit  $\text{TbCl}_3$ . **A:** Anregungsspektren der einzelnen Titrationsschritte mit den Maxima bei etwa 230 und 258 nm. Die Lumineszenzintensität von  $\text{Tb}^{3+}$  wurde bei 543 nm gemessen. **B:** Auftrag der Lumineszenzintensität der einzelnen Titrationsschritte gegen das Konzentrationsverhältnis von  $\text{Tb}^{3+}$  und Zarvin. Bei etwa einem und zwei Äquivalenten  $\text{TbCl}_3$  zeigen die Kurven einen Knick entsprechend der Sättigung der EF- und darauf der CD-Bindestelle. Für die Kurve mit Anregung bei 258 nm wurden größere Spaltbreiten als bei der Aufnahme der Spektren in A benutzt (siehe Abschnitt 2.25.2). Messpuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4.

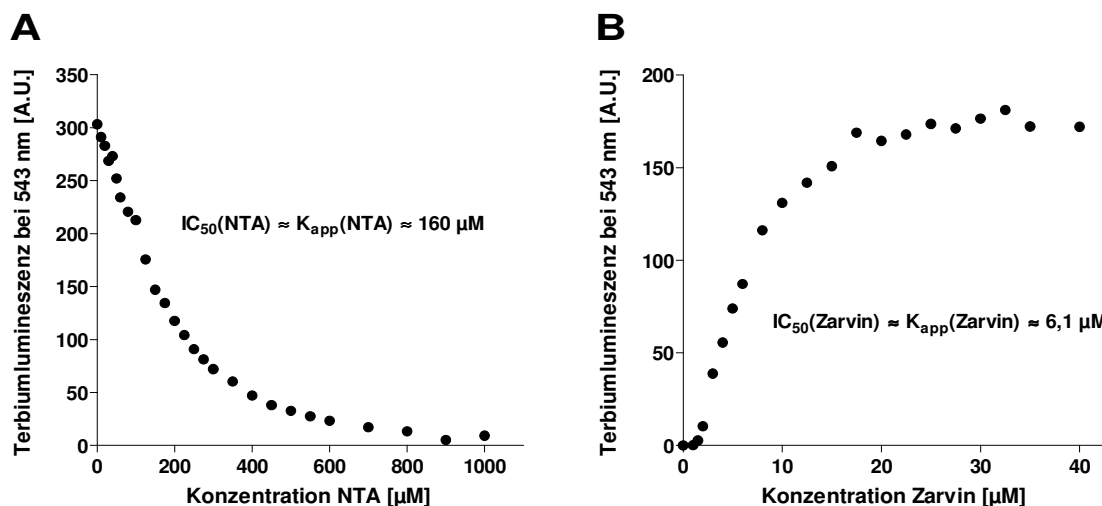
Der hier beobachtete Effekt der ungleichen Anregungseffizienz von  $\text{Tb}^{3+}$  in der CD- und der EF-Bindestelle muss bei der Interpretation einer Titrationskurve zur Affinitätsbestimmung der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an die beiden Bindestellen des Zarvins beachtet werden. Grundsätzlich sind aber beide Wellenlängenbereiche (um 230 und um 258 nm) für diesen Zweck geeignet.

### 3.7.2 Affinitätsbestimmung der Bindung von Terbium(III) an Zarvin

Die zu erwartenden Bindungsaffinitäten von Terbium(III) zu den Metallionen-Bindestellen der Parvalbumin-Domäne sind sehr hoch. Bereits für  $\text{Ca}^{2+}$  wurden niedrige nanomolare Affinitäten gemessen ([98]), wobei aufgrund der Dreiwertigkeit eine entsprechend höhere Affinität für  $\text{Tb}^{3+}$  zu erwarten ist. Daher können die beiden Affinitäten nicht mit einer direkten Titration bestimmt werden. Eine Kompetitionstitration mit Hilfe eines kleinmolekularen Chelators ist dafür nötig. Die relevanten Chelatoren komplexieren Metallionen ebenso wie das Parvalbumin über Carboxylgruppen. Daher ist die Verfolgung des Sättigungsgrades von Zarvin mit  $\text{Tb}^{3+}$  bei einer Kompetitionstitration mit einer Anregungswellenlänge von 258 nm einer Anregung bei 230 nm vorzuziehen. Für dieses Experiment wurde der oben bereits erwähnte Chelator NTA gewählt. NTA besitzt eine Bindungsaffinität für  $\text{Tb}^{3+}$  von etwa  $5,6 \times 10^{-12}$  M [128]. Diese Affinität ist hoch genug, um einen ausreichenden Kompetitionseffekt zu erzeugen. Weiterhin ist sie auch, im Vergleich zu Chelatoren wie EDTA, niedrig genug, um eine zunächst komplette Sättigung des Chelators

mit  $\text{Tb}^{3+}$  vor einer Bindung des Ions an Zarvin zu verhindern. Das Parvalbumin ist aufgrund der hohen Affinitätsdifferenz nicht in der Lage  $\text{Tb}^{3+}$  aus der Bindung mit EDTA herauszuziehen. Umgekehrt wird bei einer Titration von Zarvin: $(\text{Tb}^{3+})_2$  mit EDTA nur eine *Active-Site Titration* des Chelators gemessen. Da sich die Affinitäten der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an Zarvin sowie an NTA in einem ähnlichen Bereich befinden, ist NTA eine gute Wahl für eine Affinitätsabschätzung der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an Zarvin.

Letzteres Experiment wurde in zwei Formen durchgeführt. In einer Form wurden  $3\ \mu\text{M}$  Terbium(III)chlorid mit einem Überschuss von  $8\ \mu\text{M}$  Zarvin gesättigt. Bei diesem Konzentrationsverhältnis ist das vorgelegte  $\text{Tb}^{3+}$  nahezu komplett an die um etwa Faktor 6,5 affinere EF-Bindetasche der Parvalbumin-Domäne gebunden (siehe Anhang F: Titration  $\text{TbCl}_3$  mit Zarvin). Der vorgelegte Komplex aus Zarvin und  $\text{Tb}^{3+}$  wurde dann mit NTA titriert (Abb. 3.19A).



**Abb. 3.19:** Messung der Bindungsaffinität zwischen Terbium(III) und Zarvin. **A:** Titration von  $3\ \mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  und  $8\ \mu\text{M}$  Zarvin mit NTA. Bei diesem Überschuss an Zarvin ist  $\text{Tb}^{3+}$  nahezu ausschließlich an die EF-Bindestelle des Proteins gebunden (siehe Anhang F). Die Anwendung einer nichtlinearen Regression ist problematisch (siehe Haupttext), weshalb der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Titration als ausreichend übereinstimmend mit dem apparenten  $\text{K}_D$ -Wert von NTA betrachtet wurde. Letzterer wurde zur Berechnung der Bindungsaffinität zwischen  $\text{Tb}^{3+}$  und Zarvin benutzt (siehe Haupttext). **B:** Titration von  $0,5\ \mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  und  $100\ \mu\text{M}$  NTA mit Zarvin. Auch hier wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Titration als ausreichend übereinstimmend mit dem apparenten  $\text{K}_D$ -Wert von Zarvin betrachtet (siehe Haupttext). Messpuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Die Titrationskurven, die auf diese Art erzeugt wurden, konnten generell schlecht mittels nichtlinearer Regression beschrieben werden. Entsprechende Modelle für Kompetitions-titrations passen nicht gut in die gemessenen Datenpunkte, da die Abnahme der Lumineszenzintensität im ersten Teil der Kurven zu linear verläuft. Aufgrund langer Inkubationszeiten liegt dieses Problem nicht an einer inkompletten Ausbildung des Gleichgewichtes der Bindungen von  $\text{Tb}^{3+}$  an NTA und Zarvin. Die einzige Möglichkeit, die

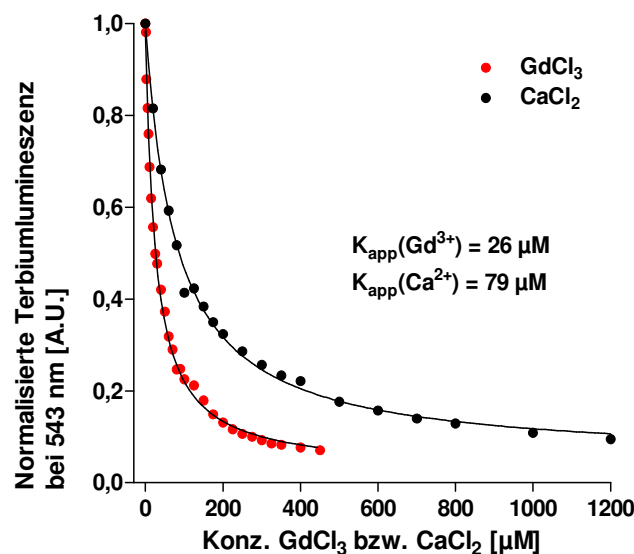
gemessenen Daten gut zu beschreiben, ist das Einpassen einer sigmoiden Gleichung (Hill-Gleichung) nach Normalisierung und Invertierung der Datenpunkte (siehe Anhang G). Allerdings verhalten sich erstens die CD- und EF-Bindestelle des Parvalbumins (bei voller Länge des Proteins) nicht kooperativ [147] und zweitens befand sich das  $\text{Tb}^{3+}$  nahezu ausschließlich in der EF-Bindestelle des Proteins. Die Hill-Gleichung ist daher in der Theorie nicht das korrekte Modell, um die gemessenen Daten zu beschreiben. Für die Affinitätsbestimmung der Bindung von Lanthanoiden an die Parvalbumin-Domäne des Zarvins wird jedoch kein exakter  $K_D$ -Wert benötigt. Aus diesem Grund wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Titrationskurve (der im Übrigen identisch zu dem mit Hilfe der Hill-Gleichung extrahierten  $K_D$ -Wert ist) als ausreichend zur Beschreibung der apparenten Affinität des Chelators NTA in dem Competitionsexperiment betrachtet. Mit Hilfe dieser apparenten Affinität (etwa  $1,6 \times 10^{-4}$  M) des Chelators NTA in Anwesenheit von 8  $\mu\text{M}$  Zarvin sowie der korrekten Affinität des Chelators zu  $\text{Tb}^{3+}$  von  $5,6 \times 10^{-12}$  M konnte die Affinität der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an die EF-Bindestelle des Zarvins berechnet werden (siehe Abschnitt 2.25.2 für Details). Die Affinität extrahiert aus drei Titrationsen liegt dabei in einem Bereich von  $2,6 \times 10^{-13}$  M bis  $3,0 \times 10^{-13}$  M und ist damit eine gute Größenordnung höher als die Affinität des Chelators. Der  $K_D$ -Wert der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an die CD-Bindestelle des Zarvins kann entsprechend als etwa um den Faktor 6,5 höher betrachtet werden.

Als Kontrolle dieser Titrationsen wurde das Experiment zur Affinitätsabschätzung der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an Zarvin in einer zweiten Form durchgeführt. Dafür wurden 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  sowie 100  $\mu\text{M}$  NTA vorgelegt und mit Zarvin titriert (Abb. 3.19B). Auch hier erwies sich eine Beschreibung der Daten mit Hilfe nichtlinearer Regression als problematisch abgesehen von einer sigmoiden Gleichung. Der Grund dafür könnte in diesem Falle darin liegen, dass bei geringen Zarvin-Konzentrationen zunächst auch die CD-Bindestelle des Proteins mit NTA um  $\text{Tb}^{3+}$  konkurriert (geringerer Lumineszenzbeitrag nach Anregung bei 258 nm, als EF-Bindestelle). Mit zunehmender Zarvin-Konzentration wird allerdings auch das zuvor in der CD-Bindestelle befindliche  $\text{Tb}^{3+}$  von der EF-Bindestelle gebunden (siehe Anhang F), was eine Sigmoidität der Titrationskurve verursachen könnte. Der extrahierte  $\text{IC}_{50}$ -Wert (oder auch der  $K_D$ -Wert extrahiert mit Hilfe einer Hill-Gleichung – siehe Anhang G) von etwa 6,1  $\mu\text{M}$  Zarvin ergab zusammen mit dem  $\text{NTA}:\text{Tb}^{3+}$   $K_D$ -Wert ( $5,6 \times 10^{-12}$  M) sowie den vorgelegten 100  $\mu\text{M}$  NTA einen  $K_D$ -Wert der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an Zarvin von etwa  $3,4 \times 10^{-13}$  M. Dieser Wert deckt sich gut mit den aus dem ersten Experiment erhaltenen Werten. Auch hier ist davon auszugehen, dass der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von der Bindung des  $\text{Tb}^{3+}$  an die EF-Bindestelle der Parvalbumin-Domäne dominiert wird und die Bindungsaffinität der CD-Bindestelle etwa um den Faktor 6,5 geringer ist.

Eine Titration von vorgelegtem Zarvin und 100  $\mu\text{M}$  NTA mit  $\text{TbCl}_3$  war grundsätzlich auch möglich. Die Berechnung eines  $\text{IC}_{50}$ - oder apparenten  $K_D$ -Wertes für Zarvin wurde aber durch einen Lumineszenzbeitrag des  $\text{NTA:Tb}^{3+}$ -Komplexes bei hohen  $\text{TbCl}_3$ -Konzentrationen erschwert. Der extrahierbare  $K_{\text{app}}$ -Wert würde jedoch in derselben Größenordnung liegen, wie der  $K_{\text{app}}$ -Wert in Abb. 3.19B (siehe Anhang G).

### 3.7.3 Affinitätsbestimmung der Bindung von Gadolinium(III) an Zarvin

Nachdem ein Terbiumlumineszenz-System mit Zarvin etabliert und die Affinität von Zarvin für  $\text{Tb}^{3+}$  geschätzt worden war, konnte in einem Konkurrenzexperiment die Affinität von Zarvin für Gadolinium(III) gemessen werden. Dafür wurden 4  $\mu\text{M}$  Zarvin mit einem Überschuss von 10  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  gesättigt und mit  $\text{GdCl}_3$  titriert. Zum Vergleich wurde Terbium(III) gesättigtes Zarvin ebenfalls mit  $\text{CaCl}_2$  titriert. Abbildung 3.20 zeigt die entsprechenden Titrationskurven für beide Ionen.



**Abb. 3.20:** Konkurrenzexperiment zur Abschätzung der Bindungsaffinität von  $\text{Gd}^{3+}$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  an Zarvin. Es wurden 4  $\mu\text{M}$  Zarvin und 10  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  vorgelegt und mit  $\text{GdCl}_3$  bzw.  $\text{CaCl}_2$  titriert. Eine monophasische Konkurrenzgleichung wurde unter Vernachlässigung des relativ geringen Lumineszenzbeitrags von in der CD-Bindestelle gebundenem  $\text{Tb}^{3+}$  in die Datenpunkte eingepasst ( $R^2(\text{Gd}^{3+}) = 0,9977$ ;  $R^2(\text{Ca}^{2+}) = 0,9966$ ). Die dabei erhaltenen apparenten  $K_D$ -Werte für  $\text{Gd}^{3+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  wurden als ausreichend übereinstimmend mit den apparenten  $K_D$ -Werten der Bindungen an die EF-Bindestelle betrachtet.

Aufgrund des verhältnismäßig geringen Beitrags der CD-Bindestelle zur Gesamtlumineszenz des gesättigten Zarvins (siehe Abb. 3.18B) wurde eine monophasische Konkurrenzgleichung (siehe Abschnitt 2.25.2) in die Datenpunkte eingepasst. Eine biphasische Gleichung erzielt hier zwar einen besseren  $R^2$ -Wert, allerdings stimmt das dadurch berechnete Verhältnis der Lumineszenzbeiträge beider Bindestellen nicht gut mit zu erwartenden Werten entsprechend Abb. 3.18B überein. Dies könnte zwar durch eine im Vergleich zu dem

Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplex leicht unterschiedliche Geometrie der beiden Bindetaschen zueinander in den sukzessiv bei der Verdrängungstitration entstehenden Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>,Gd<sup>3+</sup>)- bzw. Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>,Ca<sup>2+</sup>)-Heterokomplexen erklärt werden, wodurch sich auch die Lage und der Winkel des Phenylalanins 57 (über welches die Tb<sup>3+</sup>-Ionen mittels FRET angeregt werden) wahrscheinlich leicht ändert. Die durch eine biphasische Regression erhaltenen apparenten K<sub>D</sub>-Werte bleiben dennoch zweifelhaft. Daher wurde aufgrund des geringen Lumineszenzbeitrags der CD-Bindestelle hier eine monophasische Gleichung bevorzugt und der berechnete apparente K<sub>D</sub>-Wert grob mit der Affinität der EF-Bindestelle für Gd<sup>3+</sup> bzw. Ca<sup>2+</sup> gleichgesetzt. Mit Hilfe der entsprechenden K<sub>app</sub>-Werte, der Affinität von Tb<sup>3+</sup> zu der EF-Bindestelle von etwa 3,0×10<sup>-13</sup> M sowie der vorgelegten Tb<sup>3+</sup>-Konzentration von 10 µM konnten die K<sub>D</sub>-Werte der Bindung von Gd<sup>3+</sup> bzw. Ca<sup>2+</sup> an die EF-Bindestelle berechnet werden (siehe Abschnitt 2.25.2). Für Gd<sup>3+</sup> wurde dabei ein Wert von etwa 7,8×10<sup>-13</sup> M und für Ca<sup>2+</sup> ein Wert von 2,4×10<sup>-12</sup> M ermittelt. Affinitäten dieser Ionen zu der CD-Bindestelle können wieder als um etwa Faktor 6,5 geringer betrachtet werden. Die etwas geringere Affinität von Gd<sup>3+</sup> zu der EF-Bindestelle gegenüber Tb<sup>3+</sup> kann durch den leicht geringeren Ionenradius des Tb<sup>3+</sup> von 98 pm (Gd<sup>3+</sup>: 100,0 pm) [99] und der dadurch punktförmigeren Ladung erklärt werden. Gegenüber Ca<sup>2+</sup> hat Gd<sup>3+</sup> eine um Faktor drei höhere Affinität zu den Bindestellen des Proteins. Die im niedrigen pico- (CD-Bindestelle) bzw. subpicomolaren Bereich (EF-Bindestelle) liegenden K<sub>D</sub>-Werte des Gd<sup>3+</sup> bestätigen eine hochaffine Bindung des Ions an die Parvalbumin-Domäne von Zarvin.

### 3.8 Untersuchung der Relaxationseigenschaften von Zarvin im MRT

Nachdem eine hochaffine Bindung von Gadolinium(III) an die Parvalbumin-Domäne von Zarvin nachgewiesen werden konnte, wurde das kritische Experiment für den Einsatz von Zarvin als T<sub>1</sub>-Kontrastmittel durchgeführt. Das Experiment bestand darin, die T<sub>1</sub>-Relaxivität r<sub>1</sub> des Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplexes bei den klinisch relevanten Feldstärken von 1,5 und 3 Tesla sowie bei 7 Tesla zu messen. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> mit Konzentrationen zwischen 0 und 20 µM in eine 24-Loch Platte pipettiert. Eine weitere Verdünnungsreihe wurde mit Konzentrationen zwischen 0 und 10 µM pipettiert, wobei jeweils Cetuximab in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 zu Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> gegeben wurde. Mit Hilfe dieser zweiten Verdünnungsreihe sollte untersucht werden, ob die Bindung von Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> an einen Antikörper die Relaxivität beeinflusst. Beide Verdünnungsreihen wurden anschließend in klinischen MRT-Geräten untersucht. Die Messungen wurden von

Oliver Kraff vom Erwin L. Hahn Institut für Magnetresonanztomographie (Essen) durchgeführt. Um die  $T_1$ -Relaxivitäten der einzelnen Verdünnungen zu berechnen, wurden die  $T_1$ -Relaxationszeiten der Proben mit Hilfe einer *Inversion Recovery Turbo Spin Echo (IR-TSE)* Pulssequenz gemessen. Dabei wurden die Inversionszeiten  $TI$  schrittweise zwischen 20 und 2500 ms verändert (siehe Abschnitt 2.26 für Details). Die jeweilige longitudinale Magnetisierung der einzelnen Verdünnungsstufen nach  $TI$  wurde von der Software der MRT-Geräte in eine Graustufe übersetzt. Je höher die Magnetisierung ist (ob positiv oder negativ), desto heller erscheint die Probe. Durch die Variation von  $TI$  wurde diejenige Inversionszeit  $TI_0$  abgeschätzt, bei der der Nulldurchgang der longitudinalen Magnetisierung liegt. An dem Nulldurchgang ist dementsprechend keine longitudinale Magnetisierung vorhanden. Die  $T_1$ -Relaxationszeit der einzelnen Verdünnungsstufen konnte dann mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden [131]:

$$T_1 = -TI_0 / \ln(0,5) \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Die Bilder der MRT-Aufnahmen beider Verdünnungsreihen bei 1,5, 3 und 7 Tesla nach den einzelnen  $TI$ -Zeiten befinden sich in Anhang H. Die aus diesen Bildern abgeschätzten  $TI_0$ -Zeiten der einzelnen Verdünnungsstufen sowie die damit berechneten  $T_1$ -Relaxationszeiten befinden sich in den Tabellen 3.2 und 3.3.

**Tab. 3.2:** Inversionszeiten am Nulldurchgang ( $TI_0$ ) und  $T_1$ -Zeiten der einzelnen Verdünnungsstufen von Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> bei 1,5 Tesla, 3 Tesla und 7 Tesla

Konzentration Zarvin:( $Gd^{3+}$ ) <sub>2</sub> [ $\mu M$ ]	1,5 Tesla		3 Tesla		7 Tesla	
	$TI_0$ [ms]	$T_1$ [ms]	$TI_0$ [ms]	$T_1$ [ms]	$TI_0$ [ms]	$T_1$ [ms]
0	1900	2741	1800	2597	1950	2813
0,5	1700	2453	1750	2525	1900	2741
1	1500	2164	1650	2380	1875	2705
5	800	1154	1100	1587	1600	2308
10	500	721	800	1154	1350	1948
20	300	433	500	721	900	1298

**Tab. 3.3:** Inversionszeiten am Nulldurchgang ( $TI_0$ ) und  $T_1$ -Zeiten der einzelnen Verdünnungsstufen von Cetuximab:Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> bei 1,5 Tesla, 3 Tesla und 7 Tesla

Konzentration Zarvin:( $Gd^{3+}$ ) <sub>2</sub> [ $\mu M$ ]	1,5 Tesla		3 Tesla		7 Tesla	
	$TI_0$ [ms]	$T_1$ [ms]	$TI_0$ [ms]	$T_1$ [ms]	$TI_0$ [ms]	$T_1$ [ms]
0,02	1900	2741	1800	2597	1950	2813
0,1	1850	2669	1800	2597	1950	2813
0,2	1800	2597	1800	2597	1930	2784
1	1500	2164	1650	2380	1875	2705
2	1200	1731	1500	2164	1800	2597
10	500	721	850	1226	1375	1984

Bei beiden Verdünnungsreihen kann die erwartete Reduktion der  $T_1$ -Relaxationszeit mit zunehmender Konzentration von Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> und damit des paramagnetischen  $Gd^{3+}$  beobachtet werden. Ein Vergleich der Relaxationszeiten der in beiden Verdünnungsreihen vorkommenden Konzentrationen des Komplexes (rot) zeigt, dass die Bindung von Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> an einen Antikörper zumindest keinen hier messbaren Einfluss auf die  $T_1$ -Relaxationszeit hat.

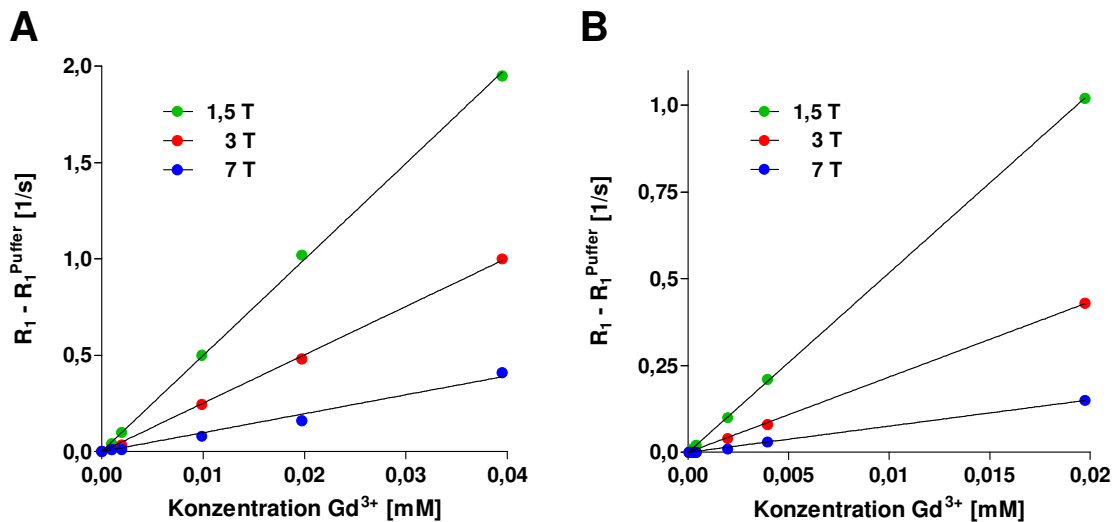
Mit Hilfe der  $T_1$ -Relaxationszeiten der einzelnen Verdünnungsstufen konnte weiterhin die Relaxivität  $r_1$  von Zarvin als Kontrastmittel entsprechend folgender Gleichung berechnet werden (siehe auch Gleichung 1.4):

$$r_1 = \frac{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_1^{Puffer}}}{[Gd^{3+}]} = \frac{R_1 - R_1^{Puffer}}{[Gd^{3+}]} \quad (\text{Gl. 3.2}),$$

wobei  $T_1$  die  $T_1$ -Relaxationszeit der jeweiligen Verdünnungsstufe in Sekunden,  $T_1^{Puffer}$  die entsprechende Relaxationszeit der Pufferkontrolle ohne Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> in Sekunden und  $[Gd^{3+}]$  die Konzentration von  $Gd^{3+}$  der jeweiligen Verdünnungsstufe ( $2 \times$  Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub>) in Millimolar ist. Der Kehrwert der Relaxationszeiten entspricht den Relaxationsraten  $R_1$  bzw.  $R_1^{Puffer}$ . In den Abbildungen 3.21A und B wurde die Differenz von  $R_1$  und  $R_1^{Puffer}$  der beiden Verdünnungsreihen gegen die Konzentration von  $Gd^{3+}$  aufgetragen. Die Relaxivitäten  $r_1$  von Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> und Cetuximab:Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> bei den drei Feldstärken wurden mittels linearer Regression mit erzwungenem Schneiden des Punktes (0|0) berechnet. Die Steigung der Geraden entspricht dabei den jeweiligen Relaxivitäten  $r_1$ . Die berechneten  $r_1$ -Werte der beiden Verdünnungsreihen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Mit steigender Feldstärke ist ein deutlicher Abfall der Relaxivitäten zu erkennen. Bei den momentan standardmäßig in der Klinik eingesetzten Feldstärken von 1,5 und 3 Tesla liegen die  $r_1$ -Werte von Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> jedoch deutlich über den Werten der meisten Kontrastmittel, die auf kleinmolekularen Chelatoren basieren. Relaxivitäten letzterer liegen meist zwischen 4 und 10 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> [41]. Der Vergleich zwischen den  $r_1$ -Werten von Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> und Cetuximab:Zarvin:( $Gd^{3+}$ )<sub>2</sub> zeigt ebenso wie der Vergleich der  $T_{l0}$ - bzw.  $T_1$ -Zeiten oben keinen nennenswerten Unterschied. Die leichten Unterschiede der  $r_1$ -Werte sind zwar bei einem 95 %-Konfidenzintervall signifikant, bei einem 99 %-Konfidenzintervall jedoch nicht mehr. Es wurden bei den Titrationsreihen für einen exakten Vergleich wahrscheinlich auch zu wenige Kontrastmittel-Konzentrationen untersucht.





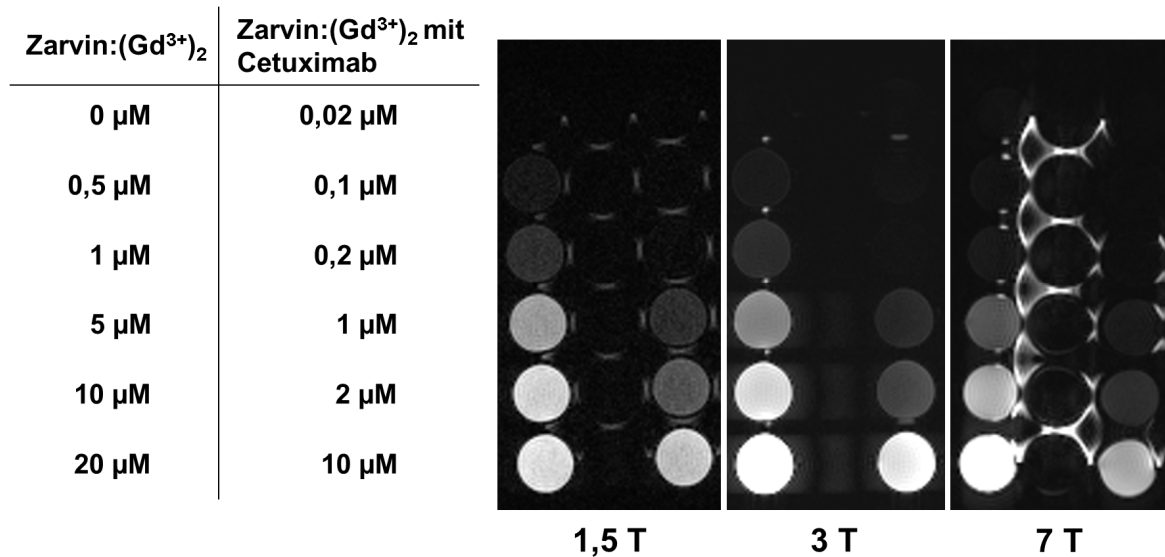
**Abb. 3.21:** Auftrag der Relaxationsdifferenz  $R_1 - R_1^{\text{Puffer}}$  gegen die  $\text{Gd}^{3+}$ -Konzentration einer Verdünnungsreihe von  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  (A) sowie einer Verdünnungsreihe von  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$ , bei der in einer Stöchiometrie von 1:2 der IgG-Antikörper Cetuximab hinzugefügt wurde (B). Die Auftragung sowie die linearen Regressionen dienen der Ermittlung der Relaxivitäten  $r_1$  des  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes in An- und Abwesenheit eines Antikörpers bei den drei Feldstärken 1,5 T, 3 T und 7 T. Die berechneten Relaxivitäten befinden sich in Tabelle 3.4.

**Tab. 3.4:** Relaxivitäten  $r_1$  von  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  und  $\text{Cetuximab}:\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$

Feldstärke	$\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$		$\text{Cetuximab}:\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$	
	$r_1$ [ $\text{mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ]	95 %-Konf.*	$r_1$ [ $\text{mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ]	95 %-Konf.*
1,5 Tesla	49,9	48,82-50,97	51,7	51,38-52,11
3 Tesla	25,1	24,45-25,81	21,7	21,05-22,37
7 Tesla	9,8	8,70-10,98	7,6	7,24-7,92

\* 95 %-Konfidenzintervall

Neben dieser quantitativen Analyse der Relaxationseigenschaften von  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  auf Basis der Relaxivität  $r_1$  wurde weiterhin qualitativ die minimale *in vitro* noch sichtbaren Kontrast gebende Konzentration von  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  bei den drei Feldstärken abgeschätzt. Dafür wurden die MRT-Aufnahmen mit der  $\text{TI}_0$ -Zeit der Pufferkontrolle herangezogen, sodass die Pufferkontrolle auf den Bildern schwarz erscheint (Abb. 3.22). Die Grauwerte der einzelnen Verdünnungsstufen von  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  stellen damit den relativ zu der Pufferkontrolle erreichten Kontrast mit der jeweiligen Konzentration des Komplexes dar. Bei 1,5 Tesla liegt die limitierende Konzentration für einen noch sichtbaren Kontrast bei etwa  $0,5 \mu\text{M}$ , bei 3 Tesla zwischen  $0,5$ - $1 \mu\text{M}$  und bei 7 Tesla zwischen  $1$ - $5 \mu\text{M}$ . Die Bedeutung dieser limitierenden Konzentrationen in Bezug auf eine mögliche *in vivo* Anwendung des Kontrastmittels  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  wird in Abschnitt 4.2 diskutiert.

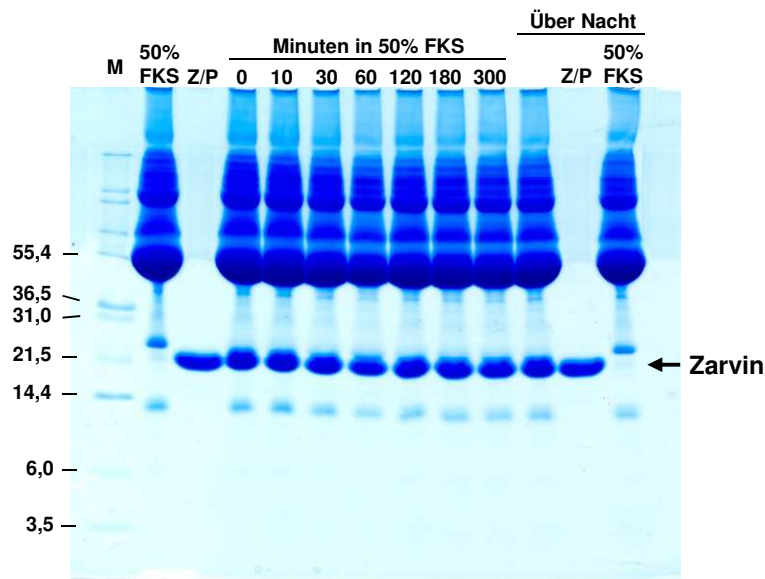


**Abb. 3.22:** Darstellung der Grauwerte der einzelnen Verdünnungsstufen von Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> (linke Spalte) und Cetuximab:Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> (rechte Spalte) bei der Inversionszeit  $T_{I_0}$  der Pufferkontrolle (erscheint dadurch schwarz) im *Inversion Recovery TSE* Experiment. Die Konzentrationswerte beziehen sich in beiden Spalten auf Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>. In der rechten Spalte befindet sich zusätzlich Cetuximab mit einer jeweils halb so hohen Konzentration. Die Grauwerte der einzelnen Verdünnungsstufen repräsentieren den im Vergleich zur Pufferkontrolle (0 µM linke Spalte) *in vitro* erreichbaren Kontrast. Die minimale *in vitro* noch Kontrast gebende Konzentration des Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> kann dadurch für die drei Feldstärken abgeschätzt werden (siehe Haupttext). Auch hier ist erkennbar, dass die Bindung des Proteins an einen Antikörper wie Cetuximab keinen Einfluss auf den entstehenden Kontrast hat.

## 3.9 Stabilität von Zarvin

### 3.9.1 Stabilität von Zarvin gegenüber proteolytischem Abbau

Für eine potentielle *in vivo* Anwendung von Zarvin oder einer Mutante davon ist es wichtig, dass das Protein unter diesen Bedingungen stabil ist. Ein dabei zu adressierender Punkt ist die Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau durch Proteasen im Blut, was ein häufiges Problem bei peptidbasierten Kontrastmitteln ist [44]. Um die Stabilität von Zarvin gegenüber proteolytischem Abbau zu untersuchen, wurden *in vivo* ähnliche Bedingungen gewählt. Dafür wurde Zarvin mit einer Konzentration von 2 mg/ml in 50 % nicht hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum bei 37 °C inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten, zunächst im Minutenbereich, bis hin zu einer Inkubation über Nacht, wurden dem Ansatz Aliquots entnommen und auf einem Schägger-Jagow-Gel [132] auf Degradation der Zarvin-Bande hin untersucht (Abb. 3.23). Dabei wurde angenommen, dass das Versetzen eines entnommenen Aliquots mit Ladepuffer und die anschließende Inkubation bei 4 °C bis zur Entnahme des letzten Aliquots jegliche Aktivität proteolytischer Enzyme stoppt.



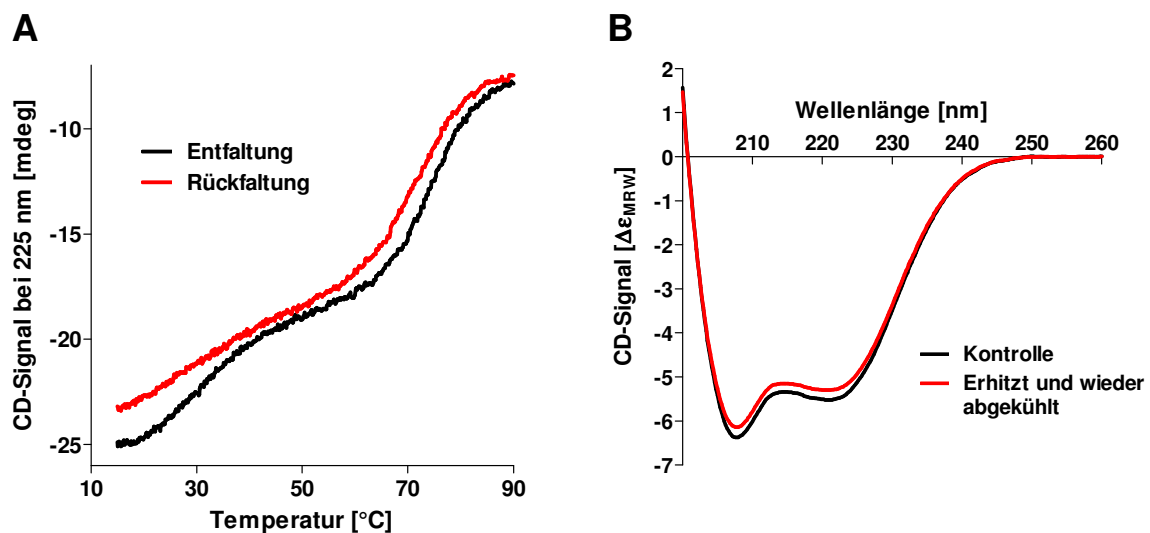
**Abb. 3.23:** Untersuchung des Zarvins auf proteolytische Degradation in fötalem Kälberserum (FKS). Nach diskreten Zeitpunkten wurden Aliquots des in 50 % FKS und 50 % PBS, pH 7,4 inkubierten Proteins entnommen und auf ein Schägger-Jagow-Gel aufgetragen. Unterhalb der Zarvin-Bande sind selbst nach Inkubation über Nacht keine Degradationsbanden sichtbar. M: Mark 12™ Proteinmarker mit den dargestellten Massen in kDa. Z/P: Zarvin.

Die Zarvin-Bande in Abb. 3.23 ist gut sichtbar, da die meisten Serumproteine oberhalb von 40 kDa laufen. Es ist erkennbar, dass selbst nach einer Inkubation über Nacht kein sichtbarer Abbau von Zarvin stattgefunden hat. Weder hat die Zarvin-Bande an Intensität verloren, noch sind in dem Gelbereich unterhalb der Zarvin-Bande Abbaubanden zu sehen. Die Aussagekraft dieses unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen durchgeführten Experimentes ist natürlich begrenzt. Es liefert keine endgültige Aussage darüber, dass Zarvin *in vivo* nicht proteolytisch degradiert wird. Weiterhin sind *in vitro* Experimente generell nicht uneingeschränkt auf *in vivo* Bedingungen übertragbar. Dennoch liefert das durchgeführte Experiment einen guten Hinweis dafür, dass Zarvin im Blutserum wahrscheinlich zumindest für ein paar Stunden stabil ist.

### 3.9.2 Thermische Stabilität von Zarvin

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die thermische Stabilität der Faltung von Zarvin. Auch wenn das Protein unter Serumbedingungen nicht degradiert werden sollte, bedeutet es nicht, dass die Faltung komplett erhalten bleibt. Die Aufrechterhaltung der korrekten Faltung des Proteins bei 37 °C ist unabdingbar für die Funktion beider Domänen. Daher wurde die thermische Entfaltung sowohl von Zarvin, als auch von den einzelnen Domänen mittels CD-Spektroskopie untersucht. Da Zarvin in beiden Domänen einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helix besitzt, wurde das CD-Signal im Zuge der Entfaltungen bei 225 nm detektiert. Abbildung

3.24A zeigt das Faltungsverhalten von Zarvin beim Aufheizen sowie beim anschließenden Wiederabkühlen der Probe. Es ist deutlich sichtbar, dass Zarvin reversibel entfaltet. Der leicht unterschiedliche Verlauf der Kurven, insbesondere unterhalb von 45 °C, ist darauf zurückzuführen, dass die Rückfaltung mit einer höheren Geschwindigkeit (1 °C/min) gemessen wurde, als die Entfaltung (0,5 °C/min). Es kann auch sein, dass ein Bruchteil der Proteinmoleküle nicht zurückfaltet. In Abb. 3.24B ist das CD-Spektrum einer auf 90 °C erhitzten (12 Minuten Inkubation) und anschließend wieder abgekühlten Probe von Zarvin im Vergleich zu einer nicht erhitzten Probe dargestellt. Auch hier ist die Reversibilität der Entfaltung zu sehen.

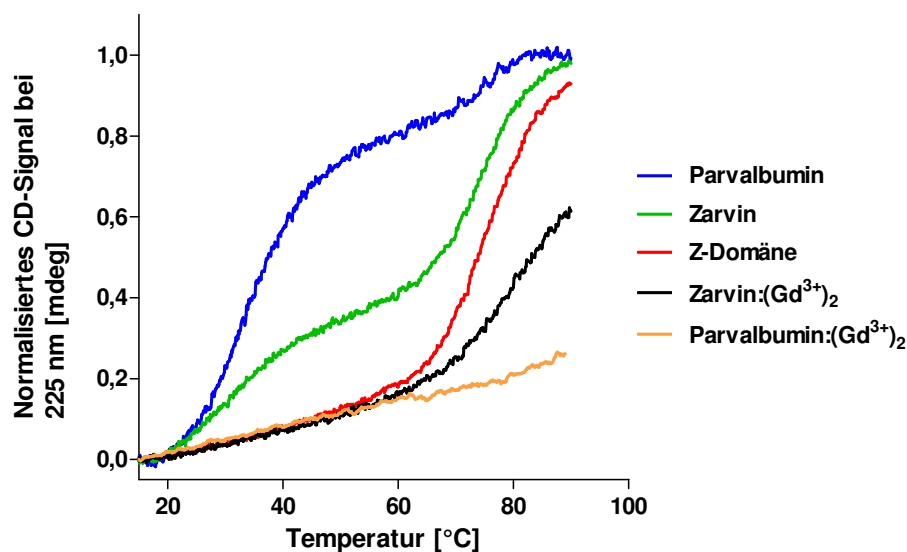


**Abb. 3.24:** Thermische Stabilität von Zarvin. **A:** Untersuchung des Faltungsverhaltens von Zarvin in Abhängigkeit von der Temperatur. Für die Faltungsstudien wurde das CD-Signal bei 225 nm und damit der  $\alpha$ -Helix Anteil des Proteins detektiert. Nahezu die komplette Proteinmenge in der Probe faltet sich wieder zurück. **B:** CD-Spektren einer unbehandelten sowie einer auf 90 °C erhitzten und anschließend wieder abgekühlten Probe von Zarvin. Auch hier ist die Rückfaltung von Zarvin erkennbar. Werden beide Spektren normalisiert, so sind sie identisch. Messpuffer: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4.

Die Tatsache, dass das Spektrum der erhitzten Probe nicht exakt dieselben Intensitäten des CD-Signals erreicht wie die Kontrollprobe, ist auch hier wahrscheinlich mit einem geringen nicht rückgefalteten und aggregierten Proteinanteil zu erklären. Die Probe wurde nach dem Erhitzen und vor der Messung zunächst abgekühlt und dann abzentrifugiert, was erklären würde, warum sich der Anteil an nicht gefaltetem Protein hier nicht in dem dafür charakteristischen Bereich des CD-Spektrums in Form eines negativeren mdeg-Signals zeigt, sondern nur durch eine geringere Intensität des gesamten Spektrums. Werden die beiden Spektren nämlich normalisiert (hier über den mdeg-Wert bei 220 nm durchgeführt), überlappen sie perfekt, was für eine komplette und korrekte Rückfaltung des Großteils des Proteins spricht. Der Prozentsatz, um den sich die mdeg-Werte der nicht normalisierten

Spektren dabei unterscheiden, liegt bei etwa 3,9 %. Dieser Prozentsatz würde der obigen Theorie nach dann dem nicht rückgefalteten Proteinanteil entsprechen.

Die Reversibilität der thermischen Entfaltung von Zarvin ist ein deutlicher Vorteil für die Haltbarkeit des Proteins während einer Lagerung, sollte es zu einer *in vivo* Anwendung kommen. In Bezug auf die thermische Stabilität von Zarvin können anhand der Entfaltungskurve aus Abb. 3.24A zwei Übergänge beobachtet werden. Der erste Übergang entspricht einer Schmelztemperatur von etwa 30 °C und der zweite einer Schmelztemperatur von etwa 72 °C. Ein Vergleich mit den thermischen Entfaltungen der separaten Z-Domäne und des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins ordnet die niedrigere Schmelztemperatur eindeutig der Parvalbumin-Domäne des Zarvins zu (Abb. 3.25). Diese geringe Schmelztemperatur resultiert aus der partiellen Instabilität des  $\alpha$ -Parvalbumins bedingt durch die Doppelpunktmutation und wurde in der Publikation der Kristallstruktur bereits gezeigt [98]. Wird die Parvalbumin-Domäne des Zarvins jedoch mit Gadolinium(III) gesättigt (schwarze Kurve in Abb. 3.25), so steigt die Schmelztemperatur dieser Domäne auf einen Wert jenseits von 70 °C und ist nicht mehr von der Schmelztemperatur der Z-Domäne unterscheidbar.



**Abb. 3.25:** Vergleich der thermischen Stabilität von Zarvin und dessen einzelner Domänen. Das thermisch instabile S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin wird durch die Sättigung mit  $Gd^{3+}$  von einer Schmelztemperatur um 30 °C auf eine Schmelztemperatur von über 90 °C stabilisiert. Die Schmelztemperaturen der einzelnen Spezies befinden sich in Tabelle 3.5. Messpuffer: 20 mM Natriumphosphat, pH 7,4. Für die  $Gd^{3+}$ -gesättigten Spezies: 20 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,4. Letzterer Puffer wurde benutzt, um eine Dissoziation des  $Gd^{3+}$  von den jeweiligen Proteinspezies aufgrund des Phosphates zu verhindern. Die Schmelztemperaturen der anderen Spezies unterscheiden sich nicht nennenswert in den beiden Puffern, was mit Zarvin getestet wurde.

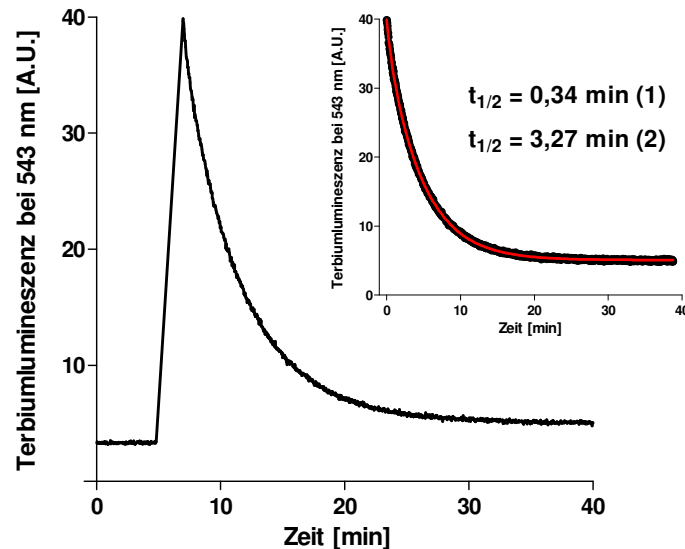
**Tab. 3.5:** Schmelztemperaturen von Zarvin und dessen einzelner Domänen sowie der entsprechenden  $\text{Gd}^{3+}$ -gesättigten Spezies.

Proteinspezies	Schmelztemperatur $t_{1/2}$ [°C]
Parvalbumin	28-30
Zarvin	28-30, ~72
Z-Domäne	~72
Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ ) <sub>2</sub>	> 90, ~72
Parvalbumin:( $\text{Gd}^{3+}$ ) <sub>2</sub>	> 90

Die mit  $\text{Gd}^{3+}$  gesättigte Form von Zarvin ist damit über einen weiten Temperaturbereich stabil. Da diese Form des Proteins die relevante Spezies für eine *in vivo* Anwendung ist, stellt eine Temperatur von 37 °C kein Problem für die Faltung von Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> dar. Die Funktionalität von Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> unter *in vivo* Bedingungen ist damit nicht von thermodynamischen Parametern limitiert, sondern von den kinetischen Eigenschaften der Dissoziation des Komplexes aus Zarvin und den Lanthanoidionen.

### 3.10 Kinetische Stabilität des Komplexes aus Zarvin und Terbium(III)

Es konnte gezeigt werden, dass Zarvin einen thermodynamisch stabilen Komplex mit Lanthanoiden bildet (Abschnitt 3.7). Weiterhin ist die Faltung von Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> bei 37 °C stabil. Um das Verhalten dieses Komplexes *in vivo* vorherzusagen ist allerdings eine Analyse der kinetischen Eigenschaften der Bindung zwischen Protein und Metallionen notwendig. Das kinetische Verhalten hat sich bereits bei kleinmolekularen Chelatoren als ein besserer Parameter zur Vorhersage der *in vivo* Stabilität erwiesen, als die entsprechende thermodynamische Stabilität der Komplexe [8]. Um die kinetische Stabilität von Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> zu untersuchen wurden erneut *in vivo* ähnliche Bedingungen mit Hilfe von fötalem Kälberserum gewählt. Weiterhin wurde für dieses Experiment Gadolinium(III) wieder durch Terbium(III) ersetzt, um die Dissoziation des Zarvin:( $\text{Tb}^{3+}$ )<sub>2</sub>-Komplexes mit Hilfe der Lumineszenz von Terbium(III) verfolgen zu können. Dafür wurden die EF- und die CD-Bindestelle von Zarvin zunächst in Puffer mit  $\text{Tb}^{3+}$  gesättigt. Anschließend wurde der Komplex in FKS auf eine Endkonzentration von 55  $\mu\text{M}$  verdünnt, wobei das FKS selbst dabei nur auf 95 % verdünnt wurde. Mittels Anregung des  $\text{Tb}^{3+}$  über 258 nm und Detektion der Lumineszenz bei 543 nm (siehe Abschnitt 3.7) konnte die Dissoziation des Komplexes über die Zeit sichtbar gemacht werden (Abb. 3.26).



**Abb. 3.26:** Kinetische Stabilität des Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplexes in fötalem Kälberserum. Der in Puffer vorinkubierte Komplex wurde zu fötalem Kälberserum gegeben und die Abnahme der Terbiumlumineszenz über die Zeit verfolgt. Das Einsatzbild zeigt die nichtlineare Regression mit einer biexponentiellen Gleichung. Der R<sup>2</sup>-Wert der Regression liegt bei 0,9993. Die biexponentielle wird einer monoexponentiellen Gleichung mit einem p-Wert < 0,0001 vorgezogen. Die Halbwertszeit von 0,34 min kann sehr wahrscheinlich der CD-Bindestelle zugeordnet werden (siehe Haupttext).

Nichtlineare Regression mit Hilfe einer biexponentiellen Gleichung (siehe Abschnitt 2.27) erzielte dabei Dissoziationskonstanten von  $3,37 \times 10^{-2}/s$  und  $3,54 \times 10^{-3}/s$  bei einer Messtemperatur von 20 °C. Die entsprechenden Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  liegen bei 0,34 min und 3,27 min. Die niedrigere Halbwertszeit von 0,34 min ist dabei sehr wahrscheinlich der Dissoziation des Tb<sup>3+</sup> von der CD-Bindestelle zuzuordnen, da diese Halbwertszeit von der Regression einem deutlich geringeren Beitrag zur Gesamtlumineszenz am Zeitpunkt Null zugeordnet wird.

Neben Phosphat sind im Blutserum v. a. die Transmetallierung durch die zweiwertigen Ionen Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> sowie die Metallionen-bindenden Eigenschaften von Serumproteinen für den Zerfall von Metall-Komplexen wie Kontrastmitteln verantwortlich. Der Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplex ist sehr stabil gegenüber der Konkurrenz durch Phosphat (siehe Anhang L). Ein Gemisch aus 55,1 µM Zarvin und 94,8 µM TbCl<sub>3</sub> (leichte Untersättigung mit Tb<sup>3+</sup>) zeigte in PBS-Puffer (~18 mM Phosphat, pH 7,4) keine nennenswerte Dissoziation des Komplexes. Dieser Effekt ist jedoch abhängig von dem Konzentrationsverhältnis zwischen Zarvin und Phosphat. Deutlich niedrigere Zarvin- bzw. höhere Phosphatkonzentrationen führen zu einer Dissoziation, deren Ausmaß abhängig von dem Konzentrationsverhältnis ist. Die im Vergleich dazu relativ niedrige Phosphatkonzentration in Blutserum ( $\leq 1,44$  mM [148]) würde die Dissoziation des Komplexes aus Zarvin und einem Lanthanoid nur bei niedrigen mikromolaren Zarvin-Konzentration beeinflussen. Um herauszufinden, ob die in FKS

gemessene Dissoziation des Komplexes nun von einer Verdrängung durch Metallionen oder durch die Aktivität Metallionen-bindender Proteine dominiert wird, wurden die Serumproteine von dem flüssigen Anteil des Kälberserums mittels Filtration in einem Centricon getrennt. Die Serumproteine wurden daraufhin in Tris-Puffer gewaschen. Es stellte sich heraus, dass die Dissoziationskonstanten bzw. Halbwertszeiten von Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> in dem flüssigen Anteil des Kälberserums exakt jenen in dem gesamten FKS entsprechen. Die gewaschenen Serumproteine hingegen erzielten Halbwertszeiten von über 90 min.

Die Metallionen Mg<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> erreichten bei Konkurrenzexperimenten wie denen in Abschnitt 3.7.3 zur Verdrängung von Tb<sup>3+</sup> lediglich K<sub>app</sub>-Werte von ca. 60 mM für Mg<sup>2+</sup> und 8,7 mM für Zn<sup>2+</sup> (siehe Anhang I). Diese Ionen spielen daher wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle bei der in Blutserum auftretenden Verdrängung von Lanthanoiden aus dem Komplex mit Zarvin. Der Hauptfaktor für diese Dissoziation ist demnach neben der Bildung von Phosphatsalzen wahrscheinlich die Verdrängung durch Ca<sup>2+</sup>, welches im Blutserum mit einer Konzentration von etwa 4 mM vertreten ist ([149], S. 479).

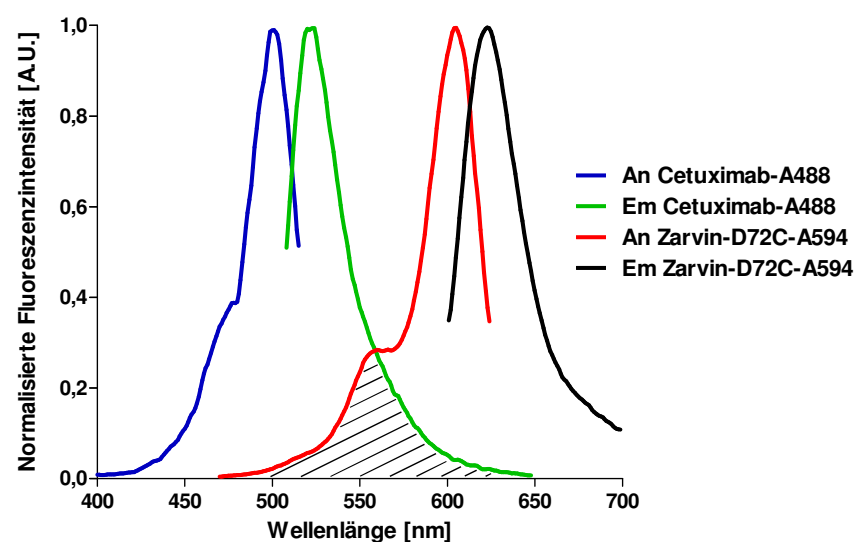
Beide Halbwertszeiten der Dissoziation von Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> in FKS liegen im geringen Minuten- bzw. im Sekundenbereich bei 20 °C und sind dementsprechend noch kürzer bei 37 °C. Da dies für eine Anwendung *in vivo* deutlich zu wenig ist, muss eine Verbesserung der kinetischen Eigenschaften der Bindung von Lanthanoiden durch die Parvalbumin-Domäne oder durch ein anderes dafür verwendetes Protein vorgenommen werden.

### 3.11 Kinetische Stabilität der Bindung von Zarvin an einen Antikörper

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Funktionalität von Zarvin *in vivo* ist die kinetische Stabilität der Bindung des Proteins an einen therapeutischen IgG-Antikörper wie Cetuximab. Im Blutserum eines erwachsenen Menschen befinden sich alleine schon konstant zwischen 4-16 mg/ml IgG-Antikörper [150], wobei die Z-Domäne auch in der Lage ist, an andere Immunglobulin-Subtypen zu binden. Dadurch sind alle im Blut befindlichen Antikörper potentielle Konkurrenten für den verwendeten therapeutischen Antikörper. Daher ist es notwendig, das kinetische Verhalten der Dissoziation von Zarvin und einem IgG-Antikörper wie Cetuximab unter ähnlichen Bedingungen zu testen, wie sie im Blutserum eines Menschen vorkommen. Zu diesem Zweck wurde ein FRET-Paar zwischen Zarvin-D72C-Atto594 und fluoreszenzmarkiertem Cetuximab etabliert. Das Dissoziationsverhalten des Cetuximab:Zarvin-Komplexes in Anwesenheit von unmarkiertem Antikörper konnte dadurch über den Zerfall des FRET-Signals verfolgt werden. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff



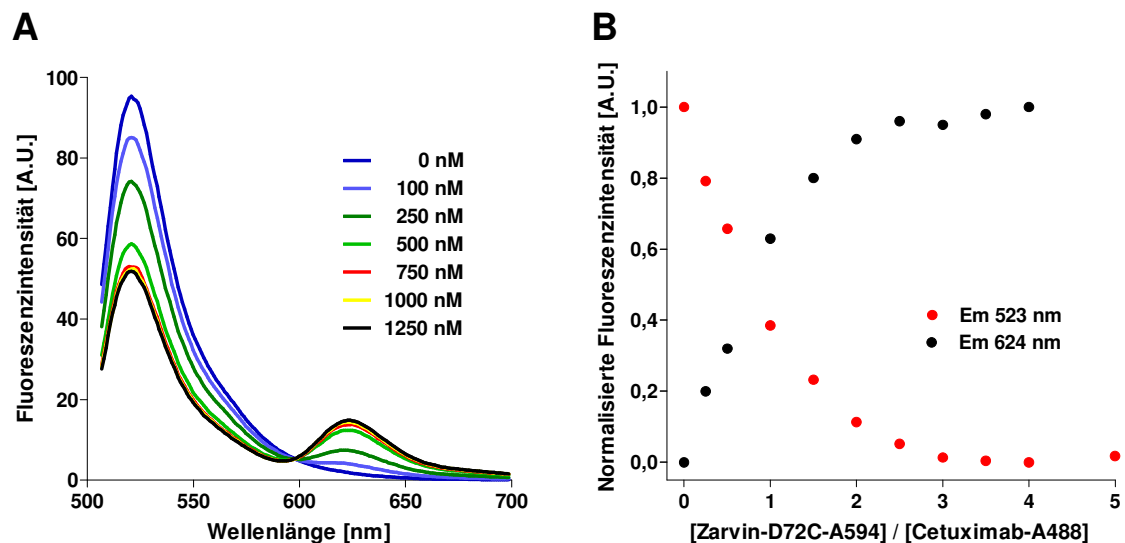
Atto488 als aminreaktives NHS-Ester-Derivat an die N-Termini bzw. an Lysine von Cetuximab gekoppelt (siehe Abschnitt 2.22.4 für Details). Die mittels UV-Vis-Spektroskopie quantifizierte Kopplungseffizienz der Reaktion betrug 1,56 Farbstoffmoleküle pro Cetuximab. Das FRET-Paar Atto488 und Atto594 besitzt laut Hersteller einen Förster-Radius  $R_0$  von 57 Å. Ein Struktur-*Alignment* der Kristallstruktur 1FC2, welche die Bindung der B-Domäne (Wildtyp der Z-Domäne) an den F<sub>c</sub>-Teil eines humanen Antikörpers darstellt, mit Zarvin zeigte, dass sich einige Lysine des Antikörpers in für einen FRET ausreichender Nähe zu der Position 72 des Zarvin-D72C befinden. Statistisch gesehen sollten demnach ausreichend viele Cetuximab-Moleküle ein für einen FRET zu Atto594 in ausreichender Nähe befindlichen Atto488-Farbstoff gekoppelt haben. Weiterhin befindet sich keines dieser Lysine direkt an der Bindestelle für die B- bzw. Z-Domäne, sodass eine Blockierung der Bindung aufgrund eines gebundenen Farbstoff-Moleküls ausgeschlossen ist. Abbildung 3.27 enthält die Anregungs- und Emissionsspektren von Cetuximab-Atto488 sowie von Zarvin-D72C-Atto594.



**Abb. 3.27:** Anregungs- und Emissionsspektren von Cetuximab-Atto488 und Zarvin-D72C-Atto594. Die Schraffur zeigt das Überlappungsintegral zwischen dem Donoremissions- und dem Akzeptoranregungsspektrum dieses FRET-Paares. An: Anregungsspektrum, Em: Emissionsspektrum.

Es ist erkennbar, dass bei diesem FRET-Paar selbst bei einer Anregung des Atto488 am entsprechenden Anregungsmaximum nur eine geringe direkte Anregung des Akzeptors Atto594 stattfindet. Die Funktionalität des FRET-Systems für die benötigte Anwendung wurde mittels einer *Active-Site Titration* von etwa 200 nM Cetuximab-Atto488 mit Zarvin-Atto594 getestet. Abbildung 3.28A zeigt die entsprechenden Emissionsspektren einer Titration nach Anregung bei 465 nm. Dabei ist sowohl eine Reduktion der Intensität der Donoremission des Atto488, als auch ein Anstieg der Intensität der Akzeptoremission des Atto594 zu verzeichnen. Das Auftragen der Emissionsintensitäten bei 523 und 624 nm gegen

das Konzentrationsverhältnis von Zarvin-D72C-Atto594 zu Cetuximab-Atto488 (Abb. 3.28B) zeigt, dass zumindest die Intensität bei 624 nm relativ genau nach zwei Äquivalenten von Zarvin-D72C-Atto594 den erwarteten Knick in der Titrationskurve erreicht.

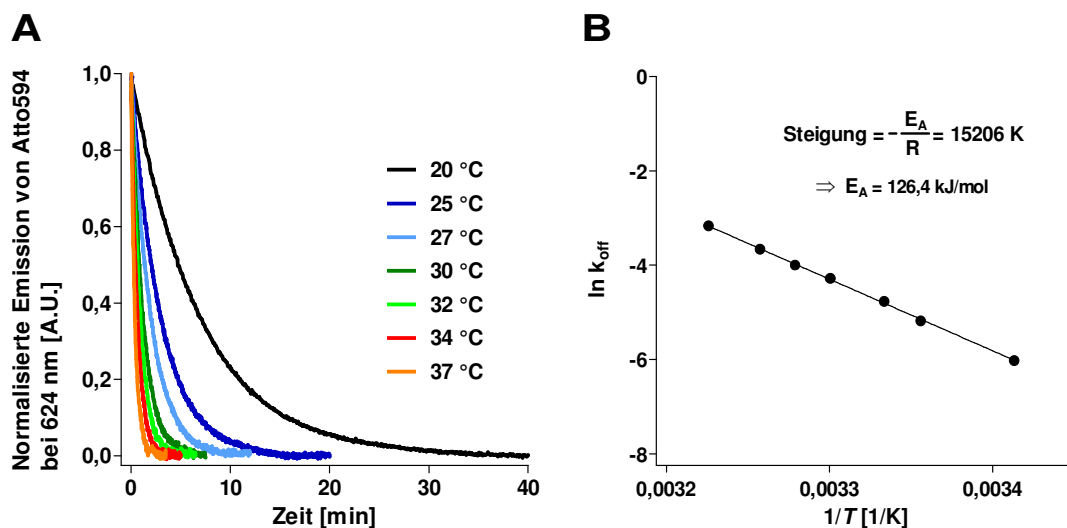


**Abb. 3.28:** Titration von 200 nM Cetuximab-Atto488 mit Zarvin-D72C-Atto594. **A:** Emissionsspektren der Titrationsschritte nach Anregung bei 465 nm. Das Signal der Donoremission des Atto488 nimmt im Zuge der Titration ab und das Signal der Akzeptoremission nimmt zu. Beide Signale erreichen einen Sättigungswert. **B:** Genauere Titration zur Verdeutlichung der Sättigung des Cetuximab-Atto488 mit Zarvin-D72C-Atto594. Die Fluoreszenzintensität bei 523 nm (Maximum der Donoremission) und bei 624 nm (Maximum der Akzeptoremission) wurde nach Anregung bei 465 nm gemessen. Bei einer Stöchiometrie von grob 2:1 erreichen die Kurven nahezu ihre Sättigung. Die leichten Abweichungen sind durch nicht mehr so exakt bestimmbare Konzentrationen des gefärbten Zarvin-D72C zu begründen. Hinzu kommt die zwar nur geringfügig aber dennoch vorhandene Addition der direkten Anregung des Akzeptors Atto594 bei jedem Titrationsschritt (Em 624 nm Kurve) sowie die eine leichte Emission des Akzeptors bei der Donoremissionswellenlänge von 523 nm (Em 523 nm Kurve). Beide Effekte führen zu einer leichten Abweichung von einer optimalen *Active-Site Titration*. Die Funktionalität des FRET-Systems ist dennoch erkennbar. Messpuffer: PBS, pH 7,4.

Aufgrund der Bindungsstöchiometrie von zwei Zarvinmolekülen pro Cetuximab entspricht der gemessene Sättigungswert den Erwartungen. Die Funktionalität des FRET-Systems konnte damit bestätigt werden.

Für die folgenden Dissoziationsexperimente wurden 100 nM Cetuximab-Atto488 mit etwa 500 nM Zarvin-D72C-Atto594 übersättigt. Der so vorinkubierte Komplex wurde anschließend zu einem Überschuss an unmarkiertem Cetuximab gegeben. Die Fluoreszenzintensität nach Anregung des Donorfarbstoffes Atto488 wurde dabei am Emissionsmaximum des Akzeptors bei 624 nm über die Zeit detektiert. Der Überschuss an unmarkiertem Cetuximab stellte bei dem Experiment sicher, dass die Dissoziation der beiden gefärbten Proteinspezies und nicht die Reassoziations von Zarvin-D72C-Atto594 mit unmarkiertem Antikörper der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten spiegeln demnach die  $k_{\text{off}}$ -Werte der Dissoziation von Cetuximab-Atto488 und Zarvin-D72C-

Atto594 wieder. Die  $k_{\text{off}}$ -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression mit Hilfe einer monoexponentiellen Gleichung ermittelt und waren mindestens in einem Bereich von 0,7-12 mg/ml (50-820-facher molarer Überschuss) unmarkierten Antikörpers im Rahmen des Fehlers konstant. Dieser Bereich deckt damit den physiologischen Konzentrationsbereich von IgG-Antikörpern ausreichend ab (siehe oben) und rechtfertigt den repräsentativen Einsatz von 0,7 mg/ml Cetuximab (5  $\mu\text{M}$ ) bei weiteren Messungen. Die Temperaturabhängigkeit der  $k_{\text{off}}$ -Werte wurde daher anschließend bei diesem Überschuss an unmarkiertem Cetuximab gemessen. Abbildung 3.29A und Tabelle 3.6 zeigen die entsprechenden Dissoziationskonstanten und Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  des Komplexes aus Cetuximab-Atto488 und Zarvin-D72C-Atto594. Die Halbwertszeiten reichen dabei von wenigen Minuten bei 20 °C bis hin zu nur gut 16 s bei 37 °C, was analog zu den gemessenen Halbwertszeiten der Terbium(III)-Dissoziation von der Parvalbumin-Domäne deutlich zu wenig für eine Anwendung *in vivo* ist.



**Abb. 3.29:** Temperaturabhängige Dissoziation des Cetuximab-Atto488:Zarvin-D72C-Atto594 Komplexes in Anwesenheit von unmarkiertem Cetuximab. **A:** Dissoziationskurven bei denen eine Mischung aus 100 nM Cetuximab-Atto488 und 500 nM Zarvin-D72C-Atto594 zu einem Überschuss von 5  $\mu\text{M}$  unmarkiertem Cetuximab gegeben wurde. Der Zerfall des FRET-Signals wurde über die Akzeptoremission (Atto594) bei 624 nm verfolgt. Die zu den einzelnen Kurven gehörenden  $k_{\text{off}}$ -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression mit Hilfe einer monoexponentiellen Gleichung ermittelt. Die  $R^2$ -Werte lagen dabei zwischen 0,9975 und 0,9999. Die  $k_{\text{off}}$ -Werte sowie die daraus berechneten Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  des Komplexes befinden sich in Tabelle 3.6. Messpuffer: PBS, pH 7,4. **B:** Arrhenius-Auftragung der natürlichen Logarithmen der  $k_{\text{off}}$ -Werte gegen den Kehrwert der Temperatur in Kelvin. Mittels linearer Regression ( $R^2 = 0,9993$ ) konnte aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergie  $E_A$  der Dissoziation des Komplexes bestimmt werden. R: Allgemeine Gaskonstante.

**Tab. 3.6:**  $k_{\text{off}}$ - und  $t_{1/2}$ -Werte der Dissoziation des Cetuximab-Atto488:Zarvin-D72C-Atto594 Komplexes

Temperatur [°C]	$k_{\text{off}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]
20	0,00243	4,75
25	0,00563	2,05
27	0,00849	1,36
30	0,01388	0,83
32	0,01828	0,63
34	0,02580	0,45
37	0,04190	0,28

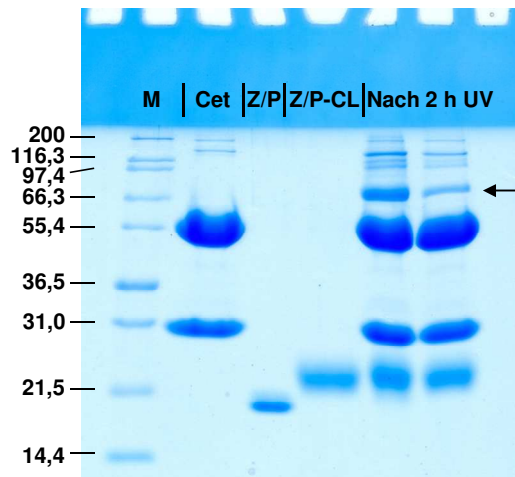
$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{off}}$$

Die Aktivierungsenergie der Dissoziation beider Proteine wurde mit Hilfe der Arrhenius-Auftragung von  $\ln(k_{\text{off}})$  gegen  $1/T$  (Abb. 3.29B) aus der Steigung der Geraden ermittelt (siehe Abb. 3.29B) und beträgt 126,4 kJ/mol bzw. 30,2 kcal/mol. Dieser empirisch ermittelte Wert kann als Referenz für bioinformatische Ansätze zur Verbesserung der kinetischen Stabilität der Interaktion zwischen Z-Domäne und IgG-Antikörpern genutzt werden. Eine Alternative zur Verbesserung der kinetischen Stabilität auf Basis nichtkovalenter Interaktionen ist die kovalente Verknüpfung beider Proteine mit Hilfe eines *Crosslinkers*.

### 3.12 Kovalente Verknüpfung von Zarvin und Cetuximab

Bei einer kovalenten Verknüpfung von Zarvin und einem IgG-Antikörper mit Hilfe eines *Crosslinkers* gibt es nicht viele Möglichkeiten abgesehen von einer Modifikation von Aminosäuren des Antikörpers. Eine solche Modifikation sollte allerdings aufgrund der Intention des Projektes, ein schnell mit unterschiedlichen Antikörpern variierbares Kontrastmittel zu entwickeln, vermieden werden. Da IgG-Antikörper keine freien Cysteine besitzen, gibt es für eine kovalente Verknüpfung von Seiten des Antikörpers nur Lysin-Seitenketten als spezifische Kopplungspunkte in der Nähe der Bindestelle der Z-Domäne. Ansonsten bleibt dort nur die Möglichkeit einer unspezifischen Kopplung. Wird unmodifiziertes Zarvin verwendet, gilt bei diesem Protein dasselbe, wobei für eine aminreaktive Kopplung noch der N-Terminus des Proteins zur Verfügung stehen würde. Dieser gehört zu der Z-Domäne des Proteins und kann aufgrund seiner Reichweite bis zu dem  $F_c$ -Teil eines Antikörpers für eine Kopplung genutzt werden. Eine kovalente Verknüpfung mittels aminreaktiver *Crosslinker* bereitet jedoch das Problem, dass dadurch auch eine Reaktion der *Crosslinker*-Moleküle mit Lysinen im  $F_{ab}$ -Teil des Antikörpers stattfinden kann. Dies könnte dazu führen, dass der Antikörper nicht mehr in der Lage ist, sein entsprechendes Antigen zu binden. Daher wäre, falls unmodifiziertes Zarvin genutzt

werden soll, eine sequenzielle Kopplung des *Crosslinkers* zunächst an Zarvin notwendig. Ungebundene *Crosslinker*-Moleküle müssen bspw. durch Dialyse entfernt werden. Erst danach könnte der Antikörper hinzugegeben werden, sodass eine spezifische Kopplung ohne Nebenreaktionen an dem Antikörper stattfindet. Das Problem bei einer solchen sequenziellen Kopplung ist jedoch, dass aminreaktive Gruppen wie NHS-Ester sehr instabil in wässriger Lösung sind und eine entsprechend niedrige Halbwertszeit haben. Daher wäre die Nutzung eines homobifunktionalen *Crosslinkers* mit zwei aminreaktiven Gruppen für eine sequenzielle Kopplung zunächst an Zarvin und danach an ein Lysin des Antikörpers kaum praktikabel. Die zweite aminreaktive Gruppe wäre unreaktiv noch bevor der Antikörper hinzugegeben würde. Daher wurde eine sequenzielle Kopplung mit Hilfe des heterobifunktionalen *Crosslinkers* Sulfo-LC-SDA durchgeführt, welcher eine Länge von 12,5 Å besitzt. Dieser enthielt sowohl eine NHS-Ester Gruppe für die Kopplung an Zarvin, als auch eine photoreaktive Diazirin-Gruppe. Letztere bildet nach Bestrahlung mit UV-Licht zwischen 330 und 370 nm Carbenintermediate, die unspezifisch mit sowohl Gruppen der Seitenketten eines Proteins, als auch mit dem Proteinrückgrat reagieren können. Abbildung 3.30 zeigt die einzelnen Schritte der Kopplung eines molaren Verhältnisses von Cetuximab:Zarvin von 1:1. Nach UV-Bestrahlung der Probe erscheint eine Bande bei gut 70 kDa, welche der Summenmasse aus dem F<sub>c</sub>-Teil (55 kDa) und Zarvin (19,2 kDa) entspricht. Trotz des Verhältnisses von 1:1 der beiden Proteine, wobei ein Antikörper zwei Zarvin-Moleküle binden kann, verschwindet die Zarvin-Bande nach der UV-Bestrahlung nicht. Die Effizienz der kovalenten Kopplung beider Proteine ist demnach nicht sehr hoch. Gründe dafür sowie Verbesserungsmöglichkeiten der Kopplungseffizienz werden in Abschnitt 4.4.2 diskutiert.



**Abb. 3.30:** Dokumentation der kovalenten Verknüpfung von Cetuximab und Zarvin mit Hilfe des heterobifunktionalen *Crosslinkers* Sulfo-LC-SDA. Spur 2 und 3 des Schägger-Jagow-Gels zeigen unmodifiziertes Cetuximab bzw. Zarvin (Z/P) vor Zugabe des *Crosslinkers*. Spur 4 zeigt Zarvin nach Kopplung des *Crosslinkers* (CL) über seine aminreaktive NHS-Ester Gruppe. Ungebundener *Crosslinker* wurde mittels Dialyse in einem Centricon entfernt. Die Verschiebung der Zarvin-Bande zu einem höheren Molekulargewicht weist auf eine hohe Kopplungseffizienz hin. Die Spuren 5 und 6 zeigen zwei Ansätze (siehe Abschnitt 2.30 für Details) nach Zugabe von Cetuximab zu Zarvin-Sulfo-LC-SDA und nach zweistündiger Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 366 nm (100 Watt UV-Lampe). Die neu hinzukommende Bande (Pfeil) markiert das Hauptresultat des *Crosslinking*. Puffer für amin- und photoreaktive Kopplung: 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7,3. M: Mark 12<sup>TM</sup> Proteinmarker mit den dargestellten Massen in kDa.

## 4. Diskussion

Die biochemische und biophysikalische Charakterisierung des *in silico* entworfenen Zweidomänen-Proteins Zarvin hat gezeigt, dass dieses sich grundsätzlich wie vorhergesagt korrekt faltet. Der Dekaglycin-*Linker* hält die beiden Domänen weit genug auf Abstand, sodass sie sich unabhängig voneinander falten können. Dies konnte mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Zarvins sowie der einzelnen Domänen eindeutig gezeigt werden. Desweiteren konnte bestätigt werden, dass die Z-Domäne trotz der in Moleküldynamik-Simulationen beobachteten transienten Interaktion mit der Parvalbumin-Domäne noch in der Lage ist, an den  $\text{F}_\text{c}$ -Bereich humaner Antikörper zu binden und dass die Interaktion mit der Parvalbumin-Domäne keinen großen Einfluss auf die Affinität zu  $\text{F}_\text{c}$ -Bereichen hat. Der entsprechende Komplex aus Zarvin und dem IgG-Antikörper Cetuximab hat ebenfalls beispielhaft auf Zellkultur-Ebene die grundsätzliche Funktionalität des modularen *Targeting*-Konzeptes bewiesen. Bezogen auf die Parvalbumin-Domäne konnte eine subpicomolare Affinität zu Lanthanoiden wie Gadolinium(III) und Terbium(III) gemessen werden, welche neben der korrekten Faltung auch die Funktionalität dieser Domäne bestätigte. Die Faltung von Zarvin ist mit gebundenen Metallionen weiterhin sehr stabil gegenüber thermischer Denaturierung und zumindest *in vitro* in fötalem Kälberserum gegenüber proteolytischem Abbau.

Dennoch ist das Protein in der vorliegenden Form nicht *in vivo* als zielführendes  $\text{T}_1$ -Kontrastmittel einsetzbar. Erstens ist die kinetische Stabilität der Interaktion der Z-Domäne mit einem Antikörper nicht hoch genug. Die Konkurrenz durch im Blutplasma vorkommende Antikörper würde bei Körpertemperatur eine Dissoziation im Sekundenbereich zur Folge haben. Auch die kinetische Stabilität der Metallionen-Bindung durch die EF- und besonders durch die CD-Bindestelle ist auf dem momentanen Stand bei weitem zu gering. Es würde durch eine Dissoziation im Sekunden- bis wenigen Minutenbereich nicht nur die Funktionalität als Kontrastmittel *in vivo* verhindert. Die Tatsache, dass Gadolinium(III) toxisch ist, würde einen Einsatz alleine aus Gründen der Sicherheit nicht möglich machen. Allerdings war eine sofortige *in vivo* Einsetzbarkeit auch nicht das Ziel bei dem Entwurf von Zarvin. Im Vordergrund standen zunächst erreichbare Relaxivitätswerte im Feldstärkenbereich um 1,5 Tesla durch die direkte Kopplung von Gadolinium(III) an ein Protein wie das Parvalbumin. Die entsprechend durchgeführten Messungen an klinischen MRT-Geräten haben hier zumindest bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) hohe Relaxivitäten bei 1,5 und auch bei 3 Tesla bestätigt. Diese hohen Werte

rechtfertigen weitere Bemühungen zur Einsetzbarkeit direkt an Proteine gekoppelter Gadolinium(III)-Ionen. Daher werden die gemessenen Relaxivitäten hier zunächst soweit es möglich ist analysiert, um mögliche Verbesserungen auch hinsichtlich weiterer Ansätze zur Erhöhung der kinetischen Stabilität eines Protein: $\text{Gd}^{3+}$ -Komplexes vorschlagen zu können. Lösungen für eine stabilere Z-Domänen:Antikörper-Interaktion werden ebenfalls diskutiert.

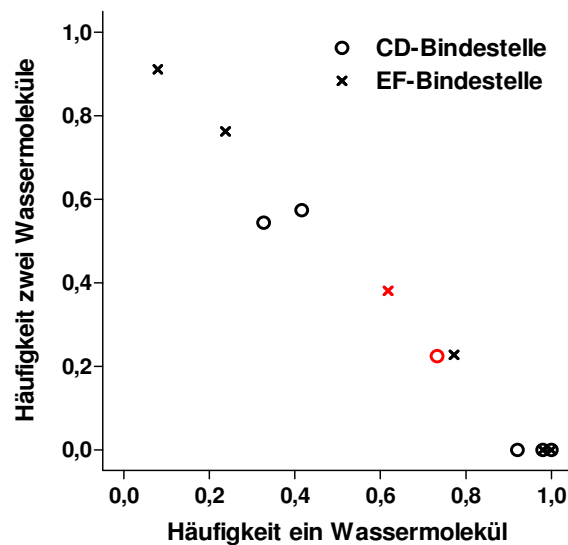
## 4.1 Analyse der Relaxivitäten von Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub>

Die bei 1,5 und 3 Tesla gemessenen  $T_1$ -Relaxivitäten von ca. 49,9 und 25,1  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  liegen weniger als Faktor zwei unter den geschätzten optimal erreichbaren Relaxivitäten bei diesen Feldstärken (ca. 80  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 1,5 und ca. 45  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei 3 Tesla) [42]. Da Relaxivitäten sich immer auf die Gadolinium(III)-Konzentration einer Lösung (1 mM  $\text{Gd}^{3+}$ ) beziehen, sind die gemessenen Werte Mittelwerte aus den Effekten der CD- und der EF-Bindestelle. Nur die sog. Partikelrelaxivität [13] des Zarvins, welche dann alle verfügbaren Bindestellen mit einbezieht, würde mit doppelt so hohen Werten angegeben werden (99,8 bzw. 50,2  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) bzw. für an Cetuximab gebundenes Zarvin (Stöchiometrie von 1:2) mit vierfach so hohen Werten. Eine in Abschnitt 3.4 ausgeschlossene Trimerisierung der Z-Domäne des Zarvins hätte bei erhaltener Bindefähigkeit an einen Antikörper den Vorteil gehabt, dass die Partikelrelaxivität des entsprechenden Kontrastmittels noch einmal um Faktor drei höher gewesen wäre. Die Partikelrelaxivität ist somit ein Parameter, der bei dem *Assembly*-Ansatz (siehe Abschnitt 1.3) eine Rolle spielt. Da Partikelrelaxivitäten allerdings keine Vergleichbarkeit zwischen den Effizienzen eines Kontrastmittels pro  $\text{Gd}^{3+}$ -Bindestelle erlauben, werden sie meist in der Literatur auch nur nebensächlich erwähnt.

Die genannten Optimumwerte bei 1,5 und 3 Tesla wurden auf Basis eines Kontrastmittels mit zwei Wassermolekülen in der inneren Koordinationssphäre ( $q = 2$ ), deren Lebenszeit  $\tau_m$  in der inneren Koordinationssphäre jeweils 50 ns beträgt, sowie einem Wassermolekül in der zweiten Koordinationssphäre ( $\tau_m' = 1$  ns, Distanz zu  $\text{Gd}^{3+}$  von  $r' = 3,5$  Å) berechnet. Dabei wurde ebenfalls eine jeweils für die entsprechende Feldstärke optimale Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  angenommen. Zarvin erreicht die gemessenen Relaxivitäten hingegen mit nur durchschnittlich 1,3 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre der CD- bzw. der EF-Bindestelle. Dieser Wert von  $q = 1,3$  wurde von Stefan Franke am Lehrstuhl für Bioinformatik auf Basis einer Moleküldynamik-Simulation berechnet (Abb. 4.1). Es wurde dabei das Vorhandensein von einem bzw. zwei Wassermolekülen (zu einem geringen Zeitanteil auch drei) in der inneren Koordinationssphäre der Bindungsstellen über



die Simulationszeit analysiert. Der entsprechend aus den Simulationen erhaltene Mittelwert über beide Bindestellen liegt bei etwa  $q = 1,3$ .



**Abb. 4.1:** Analyse der Anzahl an Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre der CD- und der EF-Bindestelle des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins mit Hilfe einer MD-Simulation (durchgeführt von Stefan Franke am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen). Dargestellt sind die Häufigkeitsverhältnisse von einem und zwei Wassermolekülen einzelner Simulationen sowie das über mehrere Simulationen gemittelte Häufigkeitsverhältnis (rot). Abweichungen von der Linearität sind auf einen geringen Zeitanteil von drei Wassermolekülen in der inneren Koordinationssphäre zurückzuführen. Punkte, die eine ausschließliche Häufigkeit von einem Wassermolekül über die gesamte Simulationszeit aufweisen ( $x = 1, y = 0$ ) wurden für eine bessere Lesbarkeit entlang der x-Achse leicht separiert.

Der berechnete Wert deckt sich mit einem experimentell bestimmten Anteil von Wassermolekülen in der inneren Koordinationssphäre der entsprechenden Parvalbumin-Spezies aus dem Karpfen von ebenfalls  $q = 1,3$  [151]. In Abb. 3.16 wurde bereits ein Struktur-*Alignment* des Parvalbumins aus dem Karpfen und dem S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin der Ratte dargestellt, wobei gute Strukturüberlagerungen sichtbar werden. Abbildung 4.2 zeigt hier noch ein Sequenz-*Alignment* beider Parvalbumin-Spezies. Eingefärbt wurden die EF-Bindestelle sowie speziell jene Aminosäuren, die an der Komplexierung von Metallionen beteiligt sind. Auch hier ist eine gute Übereinstimmung zu erkennen, was die Annahme bestärkt, dass sich 1,3 Wassermoleküle im Durchschnitt in der inneren Koordinationssphäre der EF- und der CD-Bindestelle des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin der Ratte befinden. Die CD-Bindestelle wurde in Abb. 4.2 nicht mit einbezogen, da sich dort bei dem Wildtyp-Parvalbumin des Karpfens kein Wassermolekül in der inneren Koordinationssphäre befindet. Dies ist bis zu höheren Säugetieren konserviert, was neben der Affinitätserhöhung der CD-Bindestelle ein zweiter Grund für die Verwendung der S55D/E59D-Mutante bei dem Entwurf von Zarvin war. Die auf diese Weise mutierte CD-Bindestelle ahmt eine EF-Bindestelle mit einem Wassermolekül in der inneren Koordinationssphäre nach.

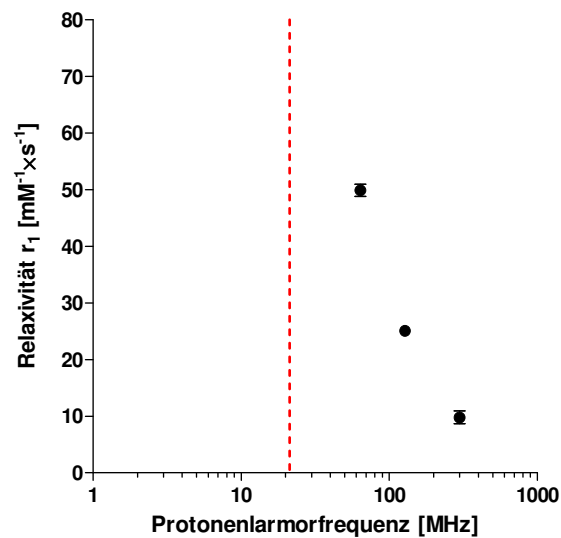
Karpfen	AFAGVLNDADIAAALEACKAADSFNHKAFFAKVGLTSKSADDVKKAFAIIDQDKSGFIEE	60
S55D/E59D-Ratte	SMTDLISAEDIKKAIGAFATAADSFDHKKFFQMVGLKKKSADDVKKVFHILDKDKDGFI	60
	: : : : * . * * * : * . * * * : * * * * . * * * * : * * * * : *	
Karpfen	DELKLFQNFKADARALTDGETKTFLKAGDSDGDKIGVDEFTALVKA-	108
S55D/E59D-Ratte	DELGSILKGFSSDARDLSAKETKTLMAAGDKDGDGKIGVEEFSTLVAES	109
	* * * : * . * . : * * * * : * * * : * * . * * * * * : * * : * *	

**Abb. 4.2:** *Alignment* der Aminosäuresequenzen der Parvalbumin-Spezies des Karpfens sowie des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins der Ratte. Die entsprechenden Reste der EF-Bindestelle sind rot gefärbt. Die Aminosäuren, welche an der Koordination eines Metallions beteiligt sind, wurden zusätzlich in cyan unterlegt. Letztere Reste sind in beiden Proteinen konserviert.

Aufgrund der niedrigen kinetischen Stabilität des  $\text{Zarvin:}(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes ist es nun durchaus von Interesse, wie hoch der Beitrag von Wassermolekülen in der zweiten Koordinationssphäre zu den gemessenen Relaxivitäten ist. Proteine und Peptide haben grundsätzlich an der Peptidbindung sowie an Seitenketten einige Donoren und Akzeptoren für Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen bzw. mit dem Lösungsmittel austauschende Protonen. Sollten nur etwa 20 % der gemessenen Relaxivität bei 1,5 Tesla auf Effekten der zweiten Koordinationssphäre beruhen, wäre es lohnend, ein auf dem Parvalbumin basiertes Kontrastmittel zu entwerfen, bei dem das  $\text{Gd}^{3+}$  nach Bindung an das Protein komplett eingeschlossen wird (siehe Abschnitt 4.3). Ein solches proteinbasiertes Molekül wäre dann zumindest kinetisch stabil genug für einen Einsatz *in vivo*.

Es wäre denkbar, dass die gemessenen Relaxivitäten des  $\text{Zarvin:}(\text{Gd}^{3+})_2$ -Komplexes entweder durch eine für 1,5 Tesla optimale Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  zustande kommen, wie es im Prinzip zu Beginn des Projektes geplant war, oder durch einen Beitrag mehrerer Wassermoleküle in der zweiten Koordinationssphäre. In ersterem Falle könnten unter Annahme eines Wassermoleküles in der zweiten Koordinationssphäre 1,3 Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre die gemessenen  $49,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  gut beschreiben. Dies würde allerdings wie gesagt einen optimalen  $\tau_r$ -Wert voraussetzen. Für die Beurteilung der Effizienz des  $\tau_r$ -Wertes von Zarvin wäre ein komplettes NMRD-Profil hilfreich, für das jedoch ein sog. *Field-Cycling* Relaxometer benötigt würde, welches allerdings nicht zur Verfügung stand. Um die Effizienz des  $\tau_r$ -Wertes abschätzen zu können wurden dennoch die drei gemessenen Relaxivitäten gegen die entsprechenden Protonenlarmorfrequenzen bei den drei Feldstärken aufgetragen, um einen Ausschnitt des NMRD-Profils von  $\text{Zarvin:}(\text{Gd}^{3+})_2$  zu erhalten (Abb. 4.3). Es ist erkennbar, dass die drei Relaxivitäten zu dem absteigenden Ast des dispergierenden  $3\tau_c$ -Terms des NMRD-Profils von Zarvin gehören. Ohne ein komplettes Profil bleibt es zwar Spekulation, aber die niedrigen 95 %-Konfidenzintervalle und der hypothetische Verlauf des NMRD-Profils durch die drei Punkte erlauben dennoch die

Aussage, dass das Maximum des dispergierenden  $3\tau_c$ -Terms sehr wahrscheinlich bei einer Feldstärke kleiner als 1,5 Tesla liegt (siehe Abb. 1.3 zum Vergleich).



**Abb. 4.3:** Ausschnitt des NMRD-Profiles von Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> mit den bei 1,5, 3 und 7 Tesla gemessenen Relaxivitäten. Die rote Linie markiert zur Orientierung die Larmorfrequenz bei 0,5 Tesla. Das Maximum des dispergierenden  $3\tau_c$ -Terms liegt aufgrund der niedrigen 95 %-Konfidenzintervalle und dem Verlauf der drei Punkte wahrscheinlich zwischen 0,5 und 1,5 Tesla.

Die Wahl des Parvalbumins mit etwa 12 kDa liefert demnach wahrscheinlich einen optimalen  $\tau_r$ -Wert für eine Feldstärke zwischen 0,5 und 1,5 Tesla. Es wäre also durchaus denkbar, dass die gemessenen Relaxivitäten des Zarvins einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag der zweiten Koordinationssphäre enthalten. Durch einen hohen Beitrag der zweiten Koordinationssphäre könnte auch die hohe Relaxivität von  $117 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  des CA1.CD2-Proteins bei 1,5 Tesla [97] (siehe Abschnitt 1.4) erklärt werden, welches  $q = 2$  Wassermoleküle in der inneren Koordinationssphäre aufweist.

Dieser Ansatz eines hohen Beitrags der zweiten Koordinationssphäre zu gemessenen Relaxivitäten bei Peptiden bzw. Proteinen wurde bereits für ein zyklisches Dekapeptid nachgewiesen [152]. Dafür wurden die dort gemessenen Relaxivitäten mit der sog. Grenoble-Methode [153] analysiert, um den ungefähren Beitrag der zweiten Koordinationssphäre zu berechnen. Letzterer betrug dort immerhin etwa 30 %. Die Grenoble-Methode wurde hier auch auf das Zarvin angewendet und wird im Folgenden beschrieben.

In Abschnitt 1.2.3 wurde bereits erwähnt, dass Beiträge der äußeren Koordinationssphäre allgemein auf etwa  $2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  geschätzt werden (basierend auf Berechnungen mit einigen Kontrastmitteln) mit nur sehr geringen Abweichungen bei unterschiedlichen Feldstärken. Es bleiben demnach die Beiträge der ersten und zweiten Koordinationssphäre zu unterscheiden. Der Beitrag der ersten Koordinationssphäre ist dabei der leichter bzw.

überhaupt vorhersagbare Anteil an der Gesamtreloxivität, da die Distanz des  $\text{Gd}^{3+}$  zu einem Wassermolekül in der inneren Koordinationssphäre mit  $3,1 \pm 0,1 \text{ \AA}$  bekannt ist. Es kann daher der Relaxivitätsanteil der inneren Koordinationssphäre mit Hilfe der vereinfachten Solomon-Gleichung (Vernachlässigung des  $7\tau_c$ -Terms) sowie Gleichung 1.4 für die Feldstärken 1,5, 3 und 7 Tesla berechnet werden, wenn die Korrelationszeit  $\tau_c$  bekannt ist bzw. geschätzt wird, welche den  $3\tau_c$ -Term der Solomon-Gleichung beschreibt. Da die Korrelationszeit  $\tau_c$  in etwa bei Feldstärken  $> 1,5$  Tesla (hier auch für 1,5 Tesla angenommen) unabhängig von der Elektronenrelaxationszeit  $\tau_{s1}$  des  $\text{Gd}^{3+}$  ist, sind die Bloembergen-Morgen Gleichungen zur Berechnung der Feldstärkenabhängigkeit von  $\tau_c$  bei diesen Feldstärken vernachlässigbar. Die Grenoble-Methode geht demnach davon aus, dass bei mittelgroßen Kontrastmitteln wie einem Peptid  $\tau_c$  nur von der Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  abhängig ist (da  $\tau_r \ll \tau_m$ ). Im Falle von Zarvin mit einem  $\tau_r$ -Wert im Nanosekundenbereich wird  $\tau_c$  zwar von  $\tau_r$  dominiert, die Lebenszeit der Wassermoleküle in der inneren Koordinationssphäre  $\tau_m$  ist jedoch nicht vernachlässigbar, wodurch  $\tau_c$  hier analog zu Gleichung 1.2 mit Hilfe der Beziehung  $\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_m^{-1}$  berechnet wurde. Dazu mussten zunächst Werte für  $\tau_r$  und  $\tau_m$  des Kontrastmittels Zarvin:  $(\text{Gd}^{3+})_2$  ermittelt werden.

Die Rotationskorrelationszeit ist dabei ein schwer zu messender Faktor, weshalb sie meist nur mit Hilfe des Stokes-Einstein-Gesetzes (Gleichung 4.1) berechnet wird [21]. Auch die Grenoble-Methode bedient sich dieser Art zur Ermittlung von  $\tau_r$ .

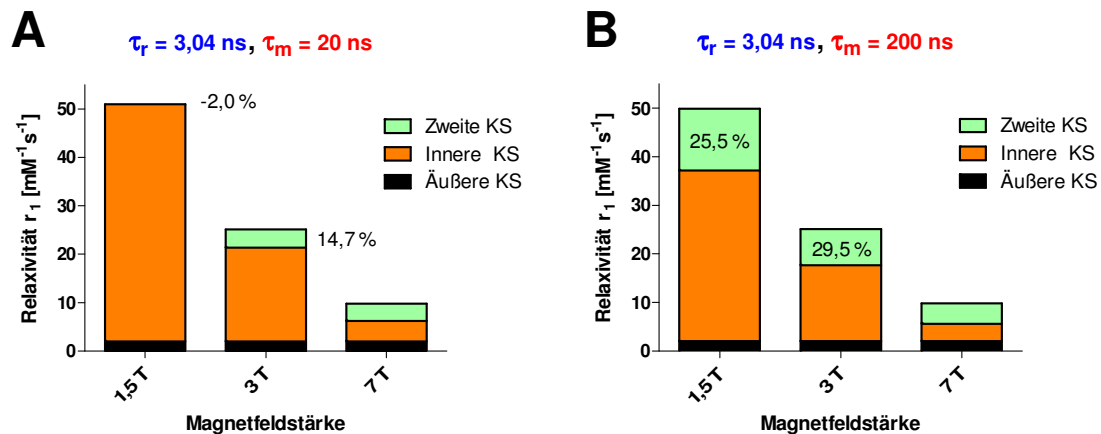
$$\tau_r = \frac{4\pi\eta a^3}{3k_B T} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

Das Stokes-Einstein-Gesetz geht vereinfachend davon aus, dass  $\tau_r$  proportional zu dem Kugelvolumen eines Moleküls mit dem Radius  $a$  und zu der Viskosität  $\eta$  sowie entgegengesetzt proportional zu der thermischen Energie ist ( $k_B$ : Boltzmann-Konstante,  $T$ : Temperatur in Kelvin). Bei der Grenoble-Methode wurde zusätzlich ein Korrekturfaktor im Zähler verwendet, der die Mikroviskosität des Lösungsmittels berücksichtigen sollte. Der Korrekturfaktor wurde mit Hilfe des gemessenen Selbstdiffusions-Koeffizienten des Kontrastmittels berechnet. Der Wert lag jedoch nur bei 1,08. Da ein Selbstdiffusions-Koeffizient für Zarvin nicht gemessen wurde und dieser im Falle des Dekapeptides  $\tau_r$  um weniger als 10 % beeinflusst hat, wurde dieser Korrekturfaktor hier vernachlässigt. Um den ungefähren  $\tau_r$ -Wert des Zarvins nun zu berechnen, wurde der Radius  $a$  des Moleküls benötigt. Dieser wird bei der Grenoble-Methode aus dem Volumen einer Kugel berechnet, deren Volumen so groß ist wie das des Ellipsoides, welches das Molekül am besten beschreibt. Der Radius  $a$  wird dann entsprechend  $a = 0,5 \times \sqrt[3]{d_1 d_2 d_3}$  mit  $d_1$ ,  $d_2$  und  $d_3$  als

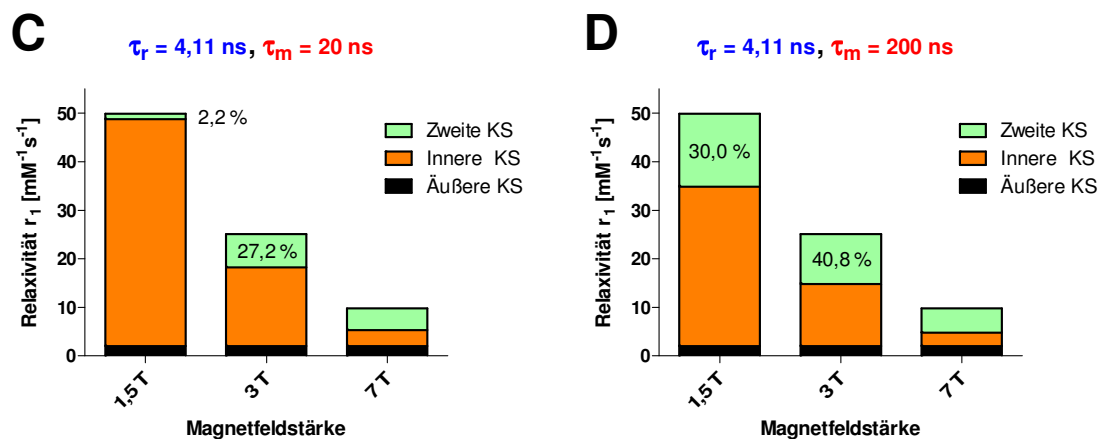
den Hauptachsen des Ellipsoides berechnet. Da die Relaxivitäten von Zarvin und an Cetuximab gebundenem Zarvin keinen messbaren Unterschied zeigten (Abschnitt 3.8), sollte  $\tau_r$  nicht stark von der Z-Domäne beeinflusst werden. Die Titration von Zarvin-S146C-AEDANS mit Cetuximab (Abschnitt 3.5) zeigte allerdings eine leichte Zunahme der Anisotropie nach Bindung des Moleküls an den Antikörper. Dies bedeutet, dass die Rotationskorrelationszeit auch zu einem geringen Anteil durch die Z-Domäne beeinflusst wird. Es wurden daher zwei Radien für das Kontrastmittel Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> berechnet, einer nur für die Parvalbumin-Domäne und einer für das gesamte Molekül. Dafür wurden jeweils drei Molekülachsen nur innerhalb der Parvalbumin-Domäne abgeschätzt und drei Achsen von denen eine die angelagerte Z-Domäne mit durchspannt (siehe Anhang J). Die daraus berechneten Radien betrugen etwa 14,3 Å für die Parvalbumin-Domäne alleine und etwa 15,8 Å für das gesamte Zarvin. Der in der Realität effektiv für den  $\tau_r$ -Wert des Gd<sup>3+</sup>-Wasserstoff-Vektors eines gebundenen Wassermoleküls verantwortliche Radius liegt demnach wahrscheinlich zwischen knapp 14 Å und gut 16 Å (unter Vernachlässigung lokaler Bewegungen der komplexierenden Aminosäuren der Bindetaschen). Die Viskosität  $\eta$  der Kontrastmittel-Lösungen lag mit hoher Wahrscheinlichkeit nahe dem Wert von  $1,0 \times 10^{-3} \text{ kg} \times \text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  für Wasser bei Raumtemperatur, da die Zarvin-Konzentrationen bis 20 µM eher gering waren. Viskositätsmessungen mit dem Modellprotein BSA einer Firma für entsprechende Geräte zeigt, dass bis etwa 140 µM BSA (~10 mg/ml) keinerlei Zunahme in der gemessenen Viskosität zu verzeichnen war und bis etwa zu der fünffachen Konzentration nur auf etwa  $1,3 \times 10^{-3} \text{ kg} \times \text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  [154]. Auch die Salzkonzentration von 150 mM in dem Messpuffer wirkt sich um weniger als 3 % auf die Viskosität aus [155]. Es wurden daher basierend auf den beiden berechneten Radien sowie einer Viskosität von  $1,0 \times 10^{-3} \text{ kg} \times \text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$   $\tau_r$ -Werte für Zarvin von 3,04 ns (14,3 Å) bzw. 4,11 ns (15,8 Å) bei 294 Kelvin (21 °C) berechnet.

Die Lebenszeit  $\tau_m$  von Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre ist für Zarvin nicht bekannt. Der  $\tau_m$ -Wert vieler Gd<sup>3+</sup>-basierter Kontrastmittel liegt jedoch zwischen 20 und 200 ns. Basierend auf den beiden  $\tau_r$ -Werten, einem  $\tau_m$ -Wert von 20 bzw. 200 ns sowie der durchschnittlichen Anzahl von 1,3 Wassermolekülen in der inneren Koordinationssphäre des Zarvins wurden nun theoretisch zu erwartende Relaxivitätsanteile dieser Koordinationssphäre berechnet (einzelne Schritte der Rechnungen siehe Anhang K). Die jeweils mit Hilfe dieser Werte berechneten Anteile der ersten, zweiten und äußeren Koordinationssphäre sind in Abb. 4.4 zusammengefasst.

## Radius Zarvin = 14,3 Å



## Radius Zarvin = 15,8 Å



**Abb. 4.4:** Relaxivitätsanteile der ersten, zweiten und äußeren Koordinationssphäre (KS) des Zarvin:  $(\text{Gd}^{3+})_2$  nach Anwendung der Grenoble-Methode zur Berechnung des theoretisch anhand der verwendeten  $\tau_r$ - und  $\tau_m$ -Werte zu erwartenden Anteils der inneren Koordinationssphäre. Für die äußere KS wurde unabhängig von der Feldstärke ein Anteil von  $2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  angenommen. Für die Anteile der zweiten KS sind bei 1,5 und 3 Tesla die jeweiligen Prozentwerte angegeben. Bei 7 Tesla sind letztere nicht angegeben, da kleine Unterschiede der äußeren KS hier aufgrund der geringeren Gesamtrelaxivität eine größere Auswirkung haben. Zudem sind eher die mittelhohen Feldstärken von 1,5 und 3 Tesla von primärem Interesse in dieser Arbeit.

Der Anteil der zweiten Koordinationssphäre ist dabei in Abhängigkeit der beiden Variablen Radius und Lebenszeit eines Wassermoleküls in der inneren Koordinationssphäre dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Größenordnung der gemessenen Relaxivitäten grundsätzlich relativ gut mit Hilfe der gewählten Parameter für  $q$ ,  $\tau_r$  und  $\tau_m$  beschrieben werden kann (unter der gerechtfertigten Annahme, dass die innere Koordinationssphäre den größten Beitrag zu der gemessenen Relaxivität leistet). Sollten in der Realität die reine Viskosität des Wassers, ein Radius von 14,3 Å und ein kurzer  $\tau_m$ -Wert von 20 ns auf Zarvin:  $(\text{Gd}^{3+})_2$  zutreffen, so wäre der Anteil der zweiten Koordinationssphäre an der Gesamtrelaxivität allgemein eher gering bzw. nicht vorhanden. Je weiter der effektiv auf das  $\text{Gd}^{3+}$  wirkende

Radius des Zarvins zu 15,8 Å hin verschoben ist, desto höher wäre der Anteil der zweiten Koordinationssphäre. Besonders bei 1,5 Tesla hat jedoch der  $\tau_m$ -Wert einen deutlich stärkeren Effekt. Sollte ein relativ langer  $\tau_m$ -Wert auf Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> zutreffen, wäre potentiell ein Anteil der zweiten Koordinationssphäre von etwa 30 % bei 1,5 Tesla möglich. Die zu höheren Feldstärken hin zunehmende Insensitivität der Relaxivität gegenüber Änderungen des  $\tau_r$ - und  $\tau_m$ -Wertes wurde in der Literatur in Simulationen bereits beschrieben [42].

Die hier auf Zarvin angewandte Grenoble-Methode zur Simulation von Relaxivitätsanteilen ist nicht ausreichend, um eine definitive Aussage über den Anteil der zweiten Koordinationssphäre auf die Gesamtexivität zu treffen. Abhängig von den zwei variierten Parametern wären bei 1,5 Tesla Anteile zwischen 0 und etwa 30 % möglich. Da die Lebenszeit  $\tau_m$  die größte Unsicherheit bei diesen Simulationen ist, wäre es lohnend letztere zu messen. Dies kann mit Hilfe von T<sub>2</sub>-Relaxationsmessungen des Wassers einer mit H<sub>2</sub><sup>17</sup>O Wasser versetzten Probe mit und ohne Kontrastmittel bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden [156,157]. Eine Alternative oder ein daran anschließendes Experiment zur Überprüfung des Anteiles der zweiten Koordinationssphäre könnte durchgeführt werden, indem die EF-Bindestelle des Wildtyp Parvalbumins der Ratte durch Mutation in eine CD-Bindestelle umgewandelt wird. Dadurch hätten beide Bindestellen für Metallionen dieser Mutante kein Wassermolekül in der inneren Koordinationssphäre mehr und die gemessene Relaxivität wäre nur noch ein Effekt der zweiten und äußeren Koordinationssphäre.

## 4.2 Analyse des *in vitro* geschätzten Detektionslimits von Zarvin

Neben der quantitativen Analyse der Relaxationseigenschaften des Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> wurden in Abschnitt 3.8 ebenfalls die limitierenden Konzentrationen des Kontrastmittels bei den drei Feldstärken geschätzt. Sind die ungefähre Anzahl von Zielstrukturen in der Zellmembran eines Zelltyps sowie das mittlere Volumen von Zellen des Letzteren bekannt, so können die Detektionslimits des Kontrastmittels mit der über die Zellvolumina gemittelten Zielstrukturkonzentration verglichen werden [24]. Über diesen Vergleich kann abgeschätzt werden, ob das Kontrastmittel in der Lage ist, die entsprechenden Zellen mit Hilfe der MRT sichtbar zu machen. Dies wird hier mit der in Abschnitt 3.6 verwendeten A431-Tumorzelllinie als Beispiel durchgeführt. Letztere exprimiert auf ihrer Oberfläche etwa 1,6-2,6×10<sup>6</sup> EGF-Rezeptoren [158,159] bei einem Zelldurchmesser zwischen 15 und 25 µm (abgemessen

anhand mikroskopierter Zellen). Dies entspricht einer ungefähren Konzentration der EGF-Rezeptoren von 0,32-2,34  $\mu\text{M}$  pro Zelle bzw. ausweitbar auch pro Zellverband. Dieser geschätzte Bereich ist in guter Übereinstimmung mit analogen Berechnungen in der Literatur zu Tumorzellen mit hoher Expressionsrate einer Zielstruktur (1  $\mu\text{M}$ ) [14]. Der Bereich liegt zumindest in der Größenordnung des Detektionslimits von Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> bei 1,5 Tesla (etwa 0,5  $\mu\text{M}$ ).

In [24] wird für einen detektierbaren Kontrast *in vivo* mit einem kleinmolekularen Chelator ( $\sim 4 \text{ mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ) eine benötigte Zielstruktur-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  berechnet. Mit der hier bei 1,5 Tesla gemessenen Relaxivität von  $49,9 \text{ mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ , welche um etwa Faktor 12,5 höher ist, wäre demnach für Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> eine Zielstruktur-Konzentration *in vivo* von etwa 10  $\mu\text{M}$  nötig. Da der 125  $\mu\text{M}$ -Wert für ein einzelnes  $\text{Gd}^{3+}$ -Ion berechnet wurde sowie zwei Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub>-Moleküle an einen Antikörper gebunden sind (welcher an die Zielstruktur bindet) reduziert sich die benötigte Konzentration auf etwa 2,5  $\mu\text{M}$ . Demnach liegt auch nach dieser Berechnung die Detektierbarkeit zellulärer Zielstrukturen durch Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> zumindest in einer erreichbaren Größenordnung. Sollte ein verbessertes Kontrastmittel in der Lage sein, mit dem entsprechenden Detektionslimit den Kontrast solcher Zielstrukturen zu erhöhen, wäre die Detektion von bspw. einer Metastase nur von der Auflösung des MRT-Gerätes abhängig. Letztere liegt für die verwendeten Feldstärken im Submillimeter-Bereich.

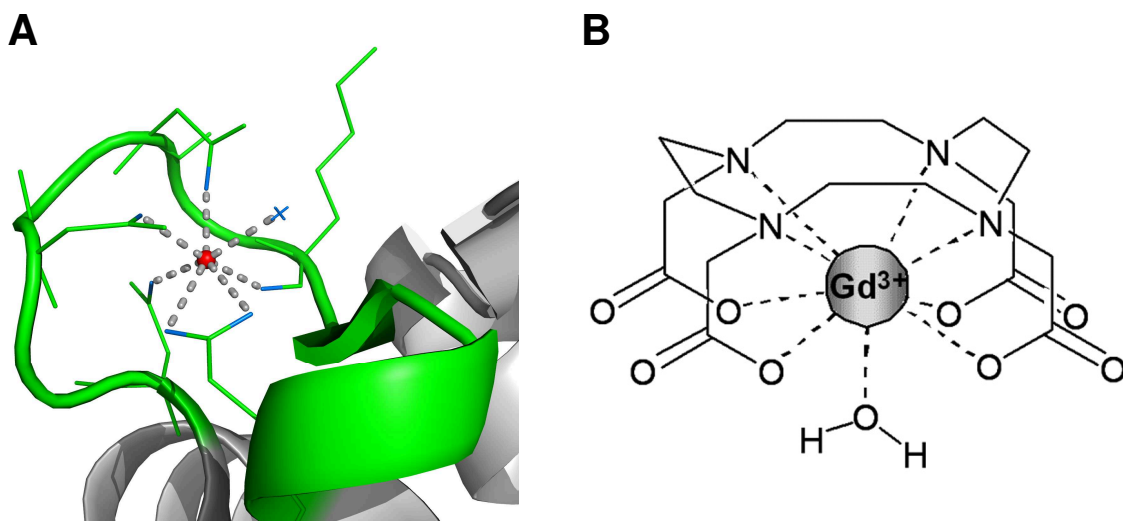
### 4.3 Kinetische Stabilität der Zarvin:Lanthanoid-Interaktion

Die mittels zeitabhängiger Terbium(III)-Lumineszenz in FKS gemessene kinetische Stabilität der Zarvin:( $\text{Tb}^{3+}$ )<sub>2</sub>-Interaktion ist mit Halbwertszeiten im niedrigen Minutenbereich (wohlgemerkt schon bei 20 °C) wie erwartet sehr gering. Entsprechende Halbwertszeiten anderer Lanthanoide wie Gadolinium(III) sind hier aufgrund ähnlicher Eigenschaften der Ionen als in derselben Größenordnung zu betrachten. Da mit Hilfe der Relaxationsmessungen allerdings eine verhältnismäßig hohe erreichbare Relaxivität durch eine direkte Kopplung des  $\text{Gd}^{3+}$  an ein Protein bestätigt werden konnte, ist eine Optimierung der kinetischen Stabilität solcher Komplexe lohnend. Um eine realistische Anwendbarkeit eines proteinbasierten Kontrastmittels zu erhalten, müssten jedoch Halbwertszeiten im Bereich von Tagen oder besser Wochen erreicht werden, wie es bei klinisch eingesetzten kleinmolekularen Chelatoren der Fall ist [160]. Dies ist kein spezielles Problem des hier untersuchten Proteins Zarvin. Auch das CA1.CD2 Protein [97] bildet, anders als in der entsprechenden Publikation behauptet, keine kinetisch stabilen Komplexe mit Lanthanoiden. Das CA1.CD2-Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht, indem es



kloniert, gereinigt und mittels zeitabhängiger Terbium(III)-Lumineszenz untersucht wurde. Ein Gemisch aus 55,1  $\mu\text{M}$  CA1.CD2 und 49,9  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  (Anregung des  $\text{Tb}^{3+}$  mittels FRET über ein in dem Protein enthaltenes Tryptophan) erwies sich dabei mit Halbwertszeiten unter einer Minute als nicht stabil in PBS-Puffer (siehe Anhang L). Das CA1.CD2 weist zwar eine deutlich höhere Selektivität der Bindung von  $\text{Gd}^{3+}$  gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  auf, als Zarvin, jedoch deutet die niedrigere Stabilität gegenüber der Competition durch Phosphat auf einen ebenso nicht stabilen Komplex in Blutserum hin. Analoge Messungen zu denen des Zarvins in FKS zeigten, dass dort mit der verfügbaren Zeitauflösung keine nennenswerte Intensität des in PBS-Puffer noch beobachtbaren Lumineszenzsignals des CA1.CD2: $\text{Tb}^{3+}$ -Komplexes messbar war.

Die Problematik der kinetischen Instabilität bei einer direkten Kopplung des  $\text{Gd}^{3+}$  an ein Protein liegt wahrscheinlich darin, dass die komplexierenden Gruppen, anders als bei kleinmolekularen Chelatoren, das  $\text{Gd}^{3+}$  nicht ausreichend umschließen. Im Falle der Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die EF-Bindestelle des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins der Ratte ist diese relativ „offene“ Komplexierung gut erkennbar (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5:** Vergleich zwischen der EF-Bindestelle des  $\alpha$ -Parvalbumins der Ratte (A) (pdb-ID: 1S3P; da die EF-Bindestelle nicht von der S55D/E59D Doppelmutation betroffen ist, wäre auch die Darstellung der Wildtyp-Struktur möglich) und dem kleinmolekularen  $\text{T}_1$ -Kontrastmittel Dotarem® (B). **A:** Aminosäurereste, die zu der EF-Bindestelle gehören, sind in grün dargestellt. Die an der Komplexierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions (rot) beteiligten Aminosäuren wurden neben der Cartoon-Darstellung noch als sog. *Lines* hervorgehoben. Die direkt an der Komplexierung beteiligten Sauerstoffatome (entnommen aus [161]) sowie das komplexierende Wassermolekül sind blau gefärbt. **B:** Dreidimensionale Darstellung der Komplexierung des  $\text{Gd}^{3+}$  durch den Chelator DOTA (entnommen aus [162]). Das  $\text{Gd}^{3+}$  wird hier von acht Liganden komplexiert, welche das Ion auch besser umschließen, als es in der relativ offenen EF-Bindestelle des Parvalbumins der Fall ist.

Das  $\text{Gd}^{3+}$  wird dabei sehr wahrscheinlich wie auch das  $\text{Ca}^{2+}$  von nur sechs Liganden komplexiert, was bei dem CA1.CD2-Protein ebenfalls eines der Probleme ist. Gadolinium(III)-basierte Kontrastmittel hingegen komplexieren das  $\text{Gd}^{3+}$  mit sieben bis acht Liganden,

welche das Ion möglichst weiträumig umschließen. Ein auf Zarvin oder einem anderen Protein basierendes verbessertes Kontrastmittel sollte somit mehr Liganden für die Komplexierung aufweisen und das Ion besser umschließen. Eine Erweiterung bzw. Verlängerung des bindenden *Loops* könnte dabei nötig sein.

Sollte sich die benötigte enorme Steigerung der kinetischen Stabilität bei der direkten Kopplung des  $\text{Gd}^{3+}$  an ein Protein trotz Optimierung der entsprechenden Bindestelle als nicht möglich erweisen, müssten in dieser Richtung andere Lösungen gefunden werden. Ein bereits in Abschnitt 4.1 erwähnter Ansatz wäre das komplette Einschließen des  $\text{Gd}^{3+}$  in der Bindestelle ohne ein Wassermolekül in der ersten Koordinationssphäre, wobei hier eben eine hohe Relaxivität bedingt durch Effekte der zweiten Koordinationssphäre notwendig wäre. Ein solcher Einschluss des  $\text{Gd}^{3+}$  wäre auf kovalenter sowie auf nicht-kovalenter Basis denkbar. Ein kovalenter Einschluss könnte bspw. mit Hilfe einer Disulfidbrücke erfolgen, welche nach Bindung des  $\text{Gd}^{3+}$  geschlossen wird, oder mit Hilfe eines organischen „Brückenmoleküls“. Ein nichtkovalenter Einschluss könnte bspw. mit einer sich an die Bindestelle anschließenden Peptidkette erfolgen, welche darauf hin optimiert ist, sich wie ein „Deckel“ auf die Bindestelle zu legen. Das dabei wahrscheinlich auch vor Bindung des  $\text{Gd}^{3+}$  auftretende Andocken dieser Verlängerung an die Bindestelle wäre ein eher geringes Problem, da die Bildung des entsprechenden  $\text{Gd}^{3+}$ -Komplexes mit Hilfe eines Überschusses an  $\text{Gd}^{3+}$  nur ein zeitlicher Faktor sein würde.

## 4.4 Interaktion des Zarvins mit Antikörpern

### 4.4.1 Die kinetische Stabilität der nichtkovalenten Interaktion

In Abschnitt 3.11 wurde die kinetische Stabilität der nichtkovalenten Interaktion zwischen Zarvin und dem IgG-Antikörper Cetuximab mit Hilfe eines FRET-Paares untersucht. Die dabei erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten bzw. Halbwertszeiten der Dissoziation beider Proteine in Anwesenheit eines Überschusses von unmarkiertem Antikörper haben aufgezeigt, dass das modulare *Targeting*-Konzept zumindest auf dem bisherigen Stand nicht *in vivo* einsetzbar ist. Abgesehen von diesem *Targeting*-Konzept bestünde jedoch die Möglichkeit, ein Zarvin-Derivat ohne einen Antikörper *in vivo* einzusetzen, wenn ein kinetisch stabiler Komplex mit dem  $\text{Gd}^{3+}$  gelingen sollte. Eine Detektion von Entzündungsherden bei Autoimmunerkrankungen wie bspw. rheumatoider Arthritis wäre denkbar, wenn zuvor ein im Verhältnis zur Gesamtantikörper-Konzentration hoher Anteil entsprechender Antikörper im Blut nachgewiesen wurde (bspw. der Rheumafaktor).

Für die Verbesserung der kinetischen Stabilität zwischen der Z-Domäne und einem Antikörper wurde die Aktivierungsenergie der Dissoziation als Referenzwert für Berechnungen auf bioinformatischer Ebene gemessen. Ein weiterer dafür nützlicher Referenzwert ist die Änderung der freien bzw. Gibbs Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$ . Im Gegensatz zu der Aktivierungsenergie  $E_A$  ( $E_A = \Delta H^\ddagger + RT$  mit  $R$  als universeller Gaskonstante und  $T$  als Temperatur in Kelvin) beschreibt  $\Delta G^\ddagger$  die Dissoziation beider Proteine nicht nur auf Basis der enthalpischen Stabilität des entsprechenden Übergangszustandes ( $\Delta H^\ddagger$ ), sondern bezieht auch die Entropieänderung  $\Delta S$  dieser Reaktion mit ein. Der  $\Delta G^\ddagger$ -Wert der Dissoziationsreaktion kann mit Hilfe der Eyring-Gleichung (Gleichung 4.2) geschätzt werden:

$$k \approx \frac{k_B T}{h} \times e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad \text{Gl. 4.2,}$$

wobei  $k$  die entsprechend gemessene Geschwindigkeitskonstante (hier  $k_{\text{off}}$ ) bei der Temperatur  $T$ ,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $R$  die allgemeine Gaskonstante ist ([163] S. 483). Mit dem bei 20 °C am exaktesten gemessenen  $k_{\text{off}}$ -Wert von  $0,00243 \text{ s}^{-1}$  ergibt sich für die Dissoziation von Zarvin und Cetuximab ein  $\Delta G^\ddagger$ -Wert von 86,4 kJ/mol bzw. 20,6 kcal/mol. Über die Gibbs-Helmholz-Gleichung kann dann mit diesem Wert sowie mit  $\Delta H^\ddagger = E_A - RT = 123,96 \text{ kJ/mol}$  ein verhältnismäßig hoher positiver Entropieanteil von  $\Delta S = 128,3 \text{ J/(mol}\times\text{K)}$  berechnet werden, der die Dissoziation der beiden Proteine stark begünstigt.

Der berechnete  $\Delta G^\ddagger$ -Wert kann in Form von folgender Beziehung als Referenzwert für Verbesserungen der Z-Domäne verwendet werden. Nach Einsetzen aller Konstanten in Gleichung 4.2 und unter Berücksichtigung einer Temperatur von 37 °C, welche die relevante Temperatur für eine Anwendung *in vivo* ist, sowie nach Logarithmieren der Gleichung mit dem dekadischen Logarithmus ergibt sich die vereinfachte Gleichung 4.3 ([163], S. 484):

$$\log_{10}(k_{\text{off}}) = 12,81 - \frac{\Delta G^\ddagger}{5,93 \text{ kJ/mol}} \quad \text{Gl. 4.3}$$

Gleichung 4.3 verdeutlicht, dass eine Steigerung des  $\Delta G^\ddagger$ -Wertes um 5,93 kJ/mol eine Verringerung der Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  um Faktor 10 verursacht (eine  $\log_{10}$ -Einheit). Wird die gemessene Halbwertszeit der Dissoziation beider Proteine bei 37 °C von etwa 16 s zugrunde gelegt, so muss für eine Anwendung *in vivo* eine Steigerung der Halbwertszeit um mindestens Faktor 100 erreicht werden ( $t_{1/2} \approx 27,6 \text{ min}$ ). Dies würde eine benötigte Steigerung des  $\Delta G^\ddagger$ -Wertes um  $2 \times 5,93 \text{ kJ/mol}$  auf etwa 98,3 kJ/mol bedeuten.

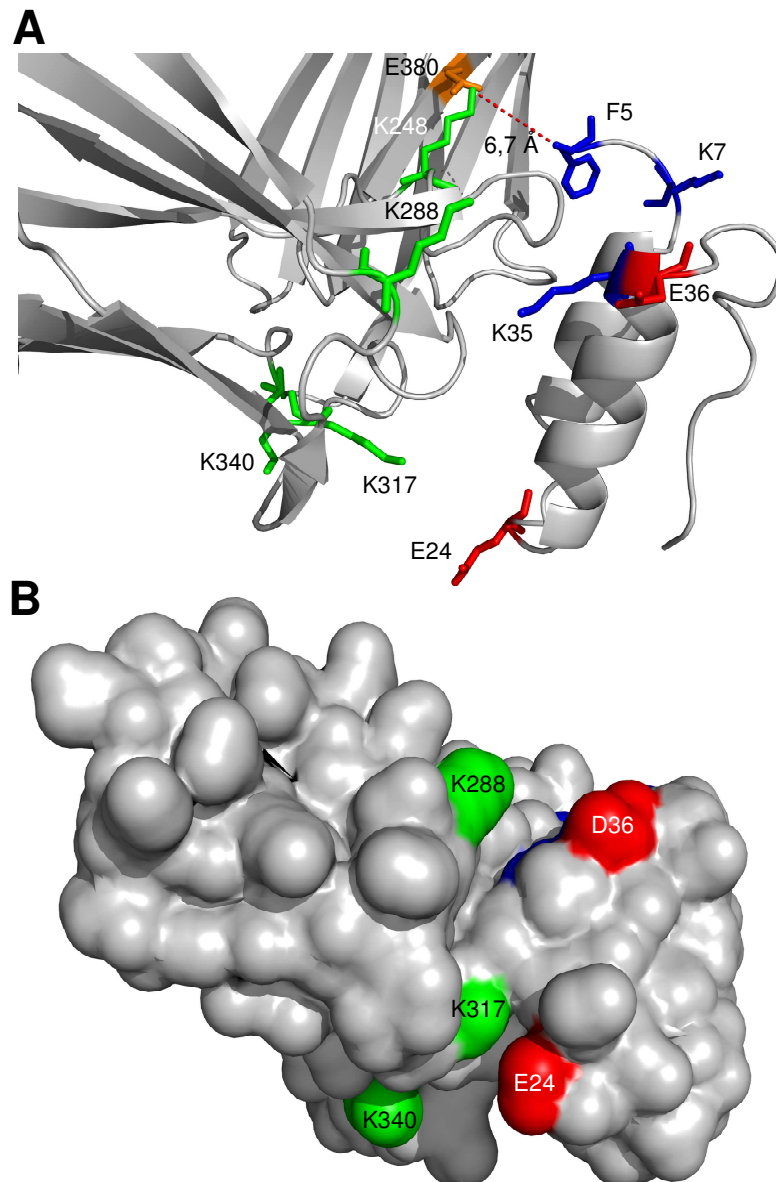
Eine solche Steigerung des  $\Delta G^\ddagger$ -Wertes wird sehr wahrscheinlich nicht alleine durch Mutation von Aminosäuren an der Bindeoberfläche zwischen dem  $F_c$ -Teil des Antikörpers und der Z-Domäne möglich sein. Da ein Antikörper innerhalb dieses Projektes zugunsten schneller Variabilität möglichst nicht modifiziert werden soll, scheidet eine Mutation von Aminosäuren des Antikörpers aus. Zudem basiert die etwa  $1234 \text{ \AA}^2$  große Bindeoberfläche zwischen beiden Proteinen größtenteils auf gegenüber Salzbrücken deutlich schwächeren hydrophoben und auch leicht hydrophilen Interaktionen [102] (siehe rot gefärbte Reste der Z-Domäne in Abb. 1.4). Ein denkbarer Ansatz zur Verbesserung der kinetischen Stabilität der Bindung beider Proteine wäre daher die Entwicklung eines auf der Z-Domäne basierenden Proteins, welches neben der bisherigen Bindungsoberfläche noch weitere Kontakte zu dem  $F_c$ -Teil ausbildet. Auf diese Weise könnte die Gesamt-Bindeoberfläche zwischen den Proteinen erhöht werden, was auch zu einer erhöhten kinetischen Stabilität führen sollte.

#### 4.4.2 Die kovalente Verknüpfung mit Hilfe eines *Crosslinkers*

Die kovalente Verknüpfung von Zarvin oder einem Derivat davon mit einem Antikörper würde zwar keine schnelle Variabilität in Bezug auf Zielstrukturen ermöglichen, aber dennoch den Faktor der Variabilität ohne eine Modifikation der Aminosäuresequenz des Antikörpers beibehalten. Aufgrund der zu vermeidenden Modifikation des Antikörpers wäre auch das Erhalten der Z-Domäne vorteilhaft, welche theoretisch bei einem *Crosslinking* nicht benötigt würde. Bei den hier begrenzten Möglichkeiten für ein *Crosslinking* hat die Z-Domäne jedoch den Vorteil, dass das Zarvin oder ein Derivat davon nicht unspezifisch an unerwünschte Positionen des Antikörpers gekoppelt wird. Für den speziellen Fall, in dem ein Antikörper keine Lysine an für die Zielstruktur-Bindung wichtigen Positionen haben sollte, wäre die Kopplung eines Parvalbumin-Derivates (ohne Z-Domäne) an Lysine sowie an die N-Termini des Antikörpers jedoch von Vorteil. Eine verhältnismäßig hohe Partikelrelaxivität könnte dabei erreicht werden.

Für allgemeine Fälle, bei denen eine unspezifische Kopplung vermieden werden sollte, werden auf Basis der Bindung mit Hilfe der Z-Domäne nun weitere Strategien für ein (semi-)spezifisches *Crosslinking* diskutiert. Zu diesem Zweck sind in Abbildung 4.6, welche die Bindung der B-Domäne an einen  $F_c$ -Teil darstellt (pdb-ID: 1FC2), solche Aminosäuren farbig markiert, die grundsätzlich chemisch für ein (semi-)spezifisches *Crosslinking* in Frage kommen bzw. sich in guten Positionen für eine Mutation befinden.

Die B-Domäne (Wildtyp der Z-Domäne) weist eine identische Oberfläche für die Bindung an  $F_c$ -Teile auf, wie die Z-Domäne und kann daher für diese Betrachtung herangezogen werden.



**Abb. 4.6:** **A:** Cartoon-Darstellung der Kristallstruktur 1FC2, welche die Bindung der B-Domäne des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* an den  $F_c$ -Teil eines humanen Antikörpers zeigt. Aminosäuren, die für die Diskussion von *Crosslinking*-Strategien wichtig sind, wurden zusätzlich durch sog. *Sticks* dargestellt. Die rein chemisch für ein *Crosslinking* in Frage kommenden Lysine des Antikörpers sind grün gefärbt. In Frage kommende Lysine sowie der sichtbare N-Terminus der B-Domäne (bzw. der Z-Domäne, welche eine identische Bindungsoberfläche aufweist) wurden blau gefärbt. Der eigentliche N-Terminus der B- bzw. Z-Domäne ist um vier Aminosäuren länger und weist somit eine potentiell noch geringere Distanz als 6,7 Å zu K248 auf. Letzteres befindet sich jedoch in einer Salzbrücke mit E340 (in anderen Ansichten deutlicher zu erkennen) und ist auch zeitweise nicht für ein *Crosslinking* verfügbar (siehe Haupttext). Die Aminosäurepositionen E24 und D36 (rot) der B- bzw. Z-Domäne sind strategisch günstig für eine Cystein-Mutation. Würde eine der beiden Positionen durch ein Cystein ersetzt, könnte ein heterobifunktionaler *Crosslinker* mit einer thiol- sowie einer aminreaktiven Gruppe genutzt werden, um eine Kopplung an K340 oder K317 bzw. an K288 durchzuführen. **B:** Darstellung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche der Kristallstruktur 1FC2. Es ist erkennbar, dass E24 oder D36 gut zugängliche Positionen sind. Eine Kopplung an die genannten Lysine sollte daher nach Einführung eines Cysteins über einen entsprechenden *Crosslinker* möglich sein.

Zunächst kann Abbildung 4.6 eine mögliche Erklärung für die niedrige Effizienz der Kopplung mit Hilfe des *Crosslinkers* Sulfo-LC-SDA liefern. Der *Crosslinker* wurde zunächst mittels seiner aminreaktiven NHS-Ester Gruppe an Zarvin gekoppelt. Die deutliche Verschiebung der Zarvin-Bande auf einem Schägger-Jagow-Gel (Abb. 3.30) nach dieser Kopplung weist dabei auf eine hohe Anzahl an gekoppelten *Crosslinker*-Molekülen pro Zarvin-Molekül hin. Es wäre demnach möglich, dass die niedrige Effizienz der Kopplung des Zarvin-Sulfo-LC-SDA an Cetuximab darauf beruht, dass der Großteil der Zarvin-Moleküle ein an Lysin 35 gekoppeltes *Crosslinker*-Molekül getragen haben. Eine solche Kopplung könnte die Bindung an einen Antikörper blockieren, da K35 zu der Bindeoberfläche gehört. Es wäre daher in Bezug auf die Verwendung eines *Crosslinkers*, der mit Hilfe einer aminreaktiven Gruppe an Zarvin gekoppelt werden soll, lohnend, K35 zu mutieren und das *Crosslinking* erneut zu testen.

Ein photoreaktiver *Crosslinker* wie Sulfo-LC-SDA ist langfristig für eine potentielle Anwendung *in vivo* nicht die optimale Wahl zur kovalenten Verknüpfung zweier Proteine. Eine weitere Möglichkeit für ein relativ spezifisches *Crosslinking* basiert auf Cystein-Mutanten des Zarvins (bzw. eines Derivates). Dadurch könnte das Protein über einen heterobifunktionalen *Crosslinker*, welcher eine thiol- sowie eine aminreaktive Gruppe besitzt, an ein Lysin des Antikörpers gekoppelt werden. Da eine thiolreaktive Reaktion auch bei pH-Werten um 6,5 noch nennenswerten Umsatz aufweist, könnte der *Crosslinker* zunächst bei einem niedrigen pH-Wert an das Cystein gekoppelt werden. Dabei sollte mit einem leichten Überschuss des *Crosslinkers* erstens die Reaktion mit dem Cystein bevorzugt sowie die NHS-Ester Gruppe möglichst lange vor einer Hydrolyse geschützt sein. Anschließende Zugabe des Antikörpers mit darauf folgender Anhebung des pH-Wertes könnte eine selektive Kopplung der beiden Proteine ermöglichen. Strategisch günstige Positionen für das Einführen eines Cysteins in die Z-Domäne wären v. a. E24 oder D36. Diese Positionen sind gut zugänglich für das Lösungsmittel und in Reichweite von K317 und K340 bzw. K288 (diese Nummerierungen beziehen sich auf die Kristallstruktur 1FC2). Das Lysin K248 steht für Kopplungen jedoch nicht zur Verfügung, da es sich in einer Salzbrücke mit E340 befindet (siehe Abb. 4.6). Dies wurde bereits mit einem nicht-sequenziellen Kopplungsansatz mit Hilfe des homobifunktionalen aminreaktiven *Crosslinkers* BS<sup>3</sup> (11,4 Å) unter diversen Bedingungen (Salzkonzentrationen, pH-Wert) getestet. Normalerweise sollte der N-Terminus des Zarvins rein von der Distanz her in der Lage sein, eine entsprechende Verknüpfung mit K248 einzugehen. Der hier durch F5 dargestellte N-Terminus der B-Domäne ist eigentlich noch um vier Aminosäuren länger, als es in der Kristallstruktur 1FC2 dargestellt ist. Die zu überbrückende Distanz zu K248 liegt daher eindeutig unter 6,7 Å und mit K4 würde auch ein weiteres, hier nicht sichtbares, Lysin zur Verfügung stehen. Aufgrund der

Flexibilität des N-Terminus hätte eine Kopplung an K248 funktionieren müssen, wenn das Lysin zumindest zeitweise für eine Kopplung zur Verfügung stehen würde. Das Ersetzen der N-terminalen Aminosäure eines Zarvin-Derivates durch ein Cystein wäre somit keine Option für eine heterobifunktionale Kopplung an einen Antikörper. Lohnend hingegen wäre das Testen einer E24C- bzw. einer D36C-Mutante. Im Gesamtkontext des Kontrastmittels ist dabei jedoch zu bedenken, dass dieser Ansatz der heterobifunktionalen Kopplung über ein Cystein wahrscheinlich nicht kompatibel mit dem Einschließen des  $Gd^{3+}$  mittels einer Disulfidbrücke ist. In einem solchen Fall müsste die Kopplung bspw. mit Hilfe eines heterobifunktionalen *Crosslinkers* wie Sulfo-LC-SDA über eine amin- und eine photoreaktive Gruppe erfolgen.

## 4.5 Ausblick

Innerhalb des mit der vorliegenden Promotionsarbeit begonnenen Projektes zur Entwicklung eines modularen proteinbasierten Kontrastmittels sollte zunächst die relaxometrische Charakterisierung des Zarvins abgeschlossen werden. Ein komplettes NMRD-Profil, aufgenommen mit einem *Field Cycling* Relaxometer, würde die Frage beantworten, wo das Maximum des Profils liegt. Die Adaptation des Molekulargewichtes eines verbesserten Kontrastmittels für die Feldstärke von 1,5 Tesla würde dadurch erleichtert werden. Zudem könnte das Profil u. a. bei einer Temperatur von 37 °C gemessen werden. Desweiteren könnten unterschiedliche *Linker*-Längen zwischen der Z-Domäne und dem Parvalbumin bzw. einem adaptierten Molekül auf ihre relaxometrischen Eigenschaften bei kleinen Feldstärken im Bereich von 0,5 Tesla getestet werden. Eine dadurch stärkere Übertragung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_r$  des Antikörpers auf das  $Gd^{3+}$ -bindende Molekül könnte bei diesen Feldstärken eine sehr hohe Relaxivität  $r_1$  zur Folge haben. Dieser recht niedrige Feldstärkenbereich ist zwar kein klinischer Standard mehr, wird jedoch in der Vorklinik noch eingesetzt. Ein entsprechend für vorklinische Zwecke adaptiertes Kontrastmittel könnte demnach auf Basis des Zarvins entwickelt werden.

Es sollte ebenfalls die Lebenszeit  $\tau_m$  eines Wassermoleküls in der ersten Koordinationssphäre von Zarvin gemessen werden. Dieser zusätzliche Parameter würde eine Zuordnung des Effektes der zweiten Koordinationssphäre auf die Gesamtrelaxivität mit Hilfe der Grenoble-Methode erlauben. Ein hoher Anteil der zweiten Koordinationssphäre (bei Zarvin theoretisch bis zu 30 %) würde entsprechende Publikationen auf diesem Feld bestärken und könnte als Basis dafür dienen, ein sehr sicheres proteinbasiertes  $T_1$ -Kontrastmittel mit komplett umschlossenem  $Gd^{3+}$  zu entwickeln.

Weitere Verbesserungen der kinetischen Stabilität der Interaktion des  $Gd^{3+}$  mit einem Protein ohne einen kompletten Einschluss sollten zunächst auf bioinformatischer Ebene bearbeitet werden. Dasselbe gilt für die Verbesserung der kinetischen Stabilität der nichtkovalenten Interaktion zwischen der Z-Domäne und einem Antikörper. Hier wäre eine Erweiterung der Bindungsoberfläche auf Basis der Z-Domäne hilfreich. Auf biochemischer Ebene hingegen könnten die diskutierten Ansätze zur Verbesserung der Effizienz einer kovalenten Verknüpfung beider Proteine getestet werden. Hierzu wären die Herstellung einer K35-Mutante des Zarvins zur erneuten Evaluierung des *Crosslinkers* Sulfo-LC-SDA sowie die Herstellung einer E24C- bzw. D36C-Mutante lohnend.

Langfristig gesehen müsste mit *in vivo* Experimenten getestet werden, ob das Konzept der variablen/ modularen Bindung von Zielstrukturen auf Basis der Z-Domäne kompatibel mit einer Ausscheidung des Kontrastmittels über die Nieren ist. Die monomere Form des Proteins ist dabei zwar von Vorteil, aber eine Bindung an physiologische Antikörper könnte diesen Ausscheidungsweg nahezu komplett verhindern, wenn das Protein nicht zumindest teilweise degradiert wird. Der Vorteil der beschleunigten Ausscheidung gegenüber Nanopartikeln wäre damit hinfällig. Sollte die kovalente Bindung des Proteins an einen therapeutischen Antikörper unumgänglich sein, würde dieses Problem *per se* auftreten. Ein mit relativ niedriger Affinität durch physiologisch vorkommende Proteasen gebundener und über die Zeit gespaltenen *Linker* wäre hier eine Optimierungsmöglichkeit zur Trennung der  $Gd^{3+}$ -bindenden Domäne von der Z-Domäne. Einen Zeitvorteil würde hier ein Kontrastmittel mit komplett eingeschlossenem  $Gd^{3+}$  bieten.

Weiterhin ist auch zu testen, ob ein proteinbasiertes Kontrastmittel auf Basis der bakteriellen Z-Domäne schon bei einmaliger Anwendung eine lebensgefährliche Immunreaktion in Form eines septischen Schocks verursachen kann. Die Humanisierung eines Moleküls auf Basis des Parvalbumins wäre dabei weniger problematisch, weil dieses Protein hoch konserviert ist.



## 5. Zusammenfassung / Abstract

Die vorliegende Promotionsarbeit befasst sich mit der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des Proteins Zarvin, welches als erster Ansatz zur Entwicklung eines variablen (modularen) Gadolinium(III)-basierten  $T_1$ -Kontrastmittels zur Detektion von Metastasen mit Hilfe der Magnetresonanztomographie dienen soll. Ein in der Literatur bisher wenig untersuchter Ansatz der direkten Kopplung des Gadolinium(III) an ein Protein sollte dabei weiter evaluiert werden, da dieser Ansatz eine hohe Effizienz des Kontrastmittels bei verhältnismäßig niedrigem Molekulargewicht erlauben würde.

Zarvin wurde am Institut für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen entwickelt und besteht zur Erfüllung dieser Aufgaben aus zwei Domänen, die durch einen flexiblen, aus zehn Glycinen bestehenden, *Linker* voneinander getrennt sind. Die sich N-terminal befindende Domäne ist eine Mutante der sog. B-Domäne des Proteins A aus dem Organismus *Staphylococcus aureus* und wird in der Literatur als Z-Domäne bezeichnet. Letztere besitzt die Eigenschaft, selektiv an den  $F_c$ -Bereich humaner (z. T. auch anderer Säugetiere) Antikörper zu binden. Diese Eigenschaft sollte hier dazu genutzt werden, dem Kontrastmittel in Kombination mit kommerziell verfügbaren therapeutischen Antikörpern eine schnell variierbare Zielführung zu unterschiedlichen Zielstrukturen zu ermöglichen. Als C-terminale Domäne des Zarvins wurde zunächst eine hoch affin  $Ca^{2+}$ -bindende Mutante eines Parvalbumin-Proteins aus der Ratte, das S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin, gewählt. Diese Domäne sollte dazu genutzt werden, zwei Gadolinium(III)-Ionen zu binden, welche dem Protein die benötigten Kontrast gebenden Eigenschaften eines  $T_1$ -Kontrastmittels verleihen.

Für die Charakterisierung von Zarvin wurden dessen Nukleotidsequenz sowie die Nukleotidsequenz der einzelnen Domänen mittels rekombinanter DNA-Technologie in einen Expressionsvektor kloniert und die entsprechend translatierten Proteine gereinigt. Mit Hilfe von CD- sowie 2D-NMR-Spektroskopie konnte eine korrekte Faltung beider Domänen innerhalb des Proteins Zarvin bestätigt werden. Die Funktionalität der Z-Domäne wurde weiterhin mittels Fluoreszenzmarkierung von Zarvin bzw. analog produzierter Cystein-Mutanten untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Protein *in vitro* mit ähnlicher Affinität wie die separate Z-Domäne an einen IgG-Antikörper bindet sowie in Kombination mit letzterem in der Lage ist, an Zellen mit entsprechenden Zielstrukturen in der Zellmembran zu binden. Die Funktionalität der Parvalbumin-Domäne in Bezug auf die Bindung von Lanthanoiden wie Gadolinium(III) wurde mit Hilfe der Etablierung eines Terbium(III)-Lumineszenz-Systems untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zarvin

Lanthanoide wie  $\text{Tb}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  mit subpicomolarer Affinität bindet. Die mittels CD-Spektroskopie untersuchte thermische Stabilität der Faltung dieser Holoform des Proteins erwies sich als sehr hoch. Ebenso war das Protein zumindest *in vitro* in fötalem Kälberserum nicht suszeptibel gegenüber proteolytischem Abbau. Beide Eigenschaften zeichnen das Protein als gutes Gerüst für die Entwicklung eines proteinbasierten Kontrastmittels aus.

Zu lösende Problematiken, die in Verbindung mit Zarvin herausgestellt wurden, sind die unter simulierten *in vivo* Bedingungen sehr niedrigen kinetischen Stabilitäten der Interaktion zwischen der Parvalbumin-Domäne und Lanthanoiden sowie zwischen der Z-Domäne und einem Antikörper. Die Charakterisierung der relaxometrischen Eigenschaften des Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> zeigte, dass eine entsprechende Optimierung dieser kinetischen Eigenschaften lohnend wäre. Die in Form der  $T_1$ -Relaxivität  $r_1$  quantifizierte Effizienz des Zarvin:( $\text{Gd}^{3+}$ )<sub>2</sub> als  $T_1$ -Kontrastmittel erwies sich im Bereich von Feldstärken um 1,5 Tesla und auch noch bei 3 Tesla als sehr hoch. Das *in vitro* bei diesen Feldstärken geschätzte Detektionslimit liegt im niedrigen mikromolaren Bereich und befindet sich damit in der Größenordnung hoch exprimierter Zielstrukturen auf Tumorzellen. Die in dieser Arbeit experimentell erhaltenen und diskutierten Ergebnisse bilden daher eine Grundlage für Ansätze zur Entwicklung eines verbesserten proteinbasierten  $T_1$ -Kontrastmittels.

### **Characterisation of a modular and protein-based contrast agent for Magnetic Resonance Imaging**

The present thesis deals with the biochemical and biophysical characterisation of the protein Zarvin, which was designed as a first approach for the development of a variable (modular) Gadolinium(III)-based  $T_1$  contrast agent capable of detecting metastases employing Magnetic Resonance Imaging. For that, a so far hardly investigated approach of directly coupling the Gadolinium(III) to a protein should be further evaluated, because in this way a highly efficient contrast agent based on a relatively low molecular weight could be developed.

Zarvin was designed at the Department of Bioinformatics at the University of Duisburg-Essen. To fulfil both of its tasks, modularity as well as contrast producing properties, Zarvin consists of two domains separated by a flexible decaglycine linker. The N-terminal domain is a mutant of the so called B-domain of protein A from *Staphylococcus aureus* and is designated as Z-domain in literature. The latter domain of Zarvin is able to bind selectively to the constant region ( $F_c$ ) of human (in part also of other mammals) IgG antibodies. This property was intended to be used in combination with commercially available therapeutic

antibodies to allow for a quick and variable targeting of the contrast agent to different physiological target structures. For the C-terminal domain of Zarvin the highly affine  $\text{Ca}^{2+}$ -binding S55D/E59D rat  $\alpha$ -Parvalbumin mutant was chosen in a first step. This domain was intended to be used for binding of two Gadolinium(III) ions and thus for providing the necessary contrast producing properties of a  $T_1$  contrast agent.

In order to be able to characterise Zarvin, the nucleotide sequences of Zarvin as well as of the single domains were cloned into an expression vector. After purification of the expressed proteins, the proper folding of both domains within the two-domain protein Zarvin was confirmed employing CD and 2D-NMR spectroscopy. Further, the functionality of the Z-domain was investigated using fluorescently labelled cystein mutants of Zarvin. It could be shown that Zarvin *in vitro* binds to an IgG antibody with an affinity similar to the separate Z-domain and that in combination with this antibody Zarvin is able to target cells expressing the respective target structures in the cell membrane. The functionality of the Parvalbumin-domain concerning the binding of lanthanides like Gadolinium(III) was investigated by establishing a Terbium(III) luminescence system. It could be shown that Zarvin binds lanthanides like  $\text{Tb}^{3+}$  and  $\text{Gd}^{3+}$  with subpicomolar affinity. The thermal stability of this holoform of the protein was investigated using CD spectroscopy and proved to be very high. Further, the protein was *in vitro* not susceptible towards proteolytic degradation in fetal calf serum. Both properties characterise Zarvin as a good scaffold for the development of a protein-based contrast agent.

Remaining problems to be solved, which were pointed out in combination with Zarvin by simulating *in vivo* conditions, are the low kinetic stabilities of the interaction between the Parvalbumin-domain and lanthanides as well as between the Z-domain and an antibody. The relaxometric characterisation of the  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  complex however showed that an optimisation of the respective kinetic properties would be worthwhile. The quantified efficiency of  $\text{Zarvin}:(\text{Gd}^{3+})_2$  in terms of the  $T_1$  relaxivity  $r_1$  proved to be very high at field strengths around 1,5 Tesla and also as clearly higher than  $r_1$  values of small molecular weight contrast agents at 3 Tesla. Concerning the detection limit of the contrast agent at these field strengths, low micromolar concentrations were estimated, which are in the range of concentrations of highly expressed target structures in the cell membrane of tumour cells. The experimentally obtained and discussed results of this thesis therefore provide a basis for further approaches to develop an improved protein-based  $T_1$  contrast agent.

# Literaturverzeichnis

- 1 Histed, S. N., Lindenberg, M. L., Mena, E., Turkbey, B., Choyke, P. L. and Kurdziel, K. A. (2012) Review of functional/anatomical imaging in oncology. *Nucl Med Commun* **33**, 349–361
- 2 Rattle, H. (1995) *An NMR primer for life scientists*, Partnership Press, Fareham, Hants
- 3 © Siemens AG Magnete, Spins und Resonanzen. Eine Einführung in die Grundlagen der Magnetresonanztomographie
- 4 Weishaupt, D., Köchli, V. D., Marincek, B., Froehlich, J. M., Nanz, D. and Prüssmann, K. P. (2009) *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung*, Springer, Heidelberg
- 5 Aime, S., Barbero L. and Botta M. (1991) Trends in NMR studies of paramagnetic Gd(III) complexes as potential contrast agents in MRI. *Magnetic Resonance Imaging* **9**, 843–847
- 6 Koenig, S. H. and Brown R.D. III (1984) Relaxation of solvent protons by paramagnetic ions and its dependence on magnetic field and chemical environment: implications for NMR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* **1**, 478–495
- 7 Lauffer, R. (1987) Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chemical Reviews* **87**, 901–927
- 8 Sherry, A. D., Caravan, P. and Lenkinski, R. E. (2009) Primer on gadolinium chemistry. *J Magn Reson Imaging* **30**, 1240–1248
- 9 Lin, S.-P. and Brown, J. J. (2007) MR contrast agents: physical and pharmacologic basics. *J Magn Reson Imaging* **25**, 884–899
- 10 Aime, S. and Caravan, P. (2009) Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging* **30**, 1259–1267
- 11 Bleavins, K., Perone, P., Naik, M., Rehman, M., Aslam, M. N., Dame, M. K., Meshinchi, S., Bhagavathula, N. and Varani, J. (2012) Stimulation of fibroblast proliferation by insoluble gadolinium salts. *Biol Trace Elem Res* **145**, 257–267
- 12 Morcos, S. K. (2011) Experimental studies investigating the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis; what did we learn so far? *Eur Radiol* **21**, 496–500
- 13 Helm, L. (2010) Optimization of gadolinium-based MRI contrast agents for high magnetic-field applications. *Future Med Chem* **2**, 385–396
- 14 Gimi, B., Pathak, A. P., Ackerstaff, E., Glunde, K., Artemov, D. and Bhujwala, Z. M. (2005) Molecular Imaging of Cancer: Applications of Magnetic Resonance Methods. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng* **93**, 784–799
- 15 Frericks, B. B., Loddenkemper, C., Huppertz, A., Valdeig, S., Stroux, A., Seja, M., Wolf, K.-J. and Albrecht, T. (2009) Qualitative and quantitative evaluation of hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver enhancement using Gd-EOB-DTPA. *AJR Am J Roentgenol* **193**, 1053–1060

- 16 Pinker, K., Grabner, G., Bogner, W., Gruber, S., Szomolanyi, P., Trattnig, S., Heinz-Peer, G., Weber, M., Fitzal, F. and Pluschnig, U. et al. (2009) A combined high temporal and high spatial resolution 3 Tesla MR imaging protocol for the assessment of breast lesions: initial results. *Invest Radiol* **44**, 553–558
- 17 Godelman, A. and Haramati, L. B. (2008) MR imaging in diagnosis and staging of pulmonary carcinoma. *Magn Reson Imaging Clin N Am* **16**, 309–17, ix
- 18 Bertini, I. and Luchinat, C. (1996) Coordination Chemistry Reviews. Chapter 1 Introduction. *Coordination Chemistry Reviews* **150**, 1–28
- 19 Banci, L., Bertini, I. and Luchinat, C. (1991) Nuclear and electron relaxation. The magnetic nucleus-unpaired electron coupling in solution, VCH, Weinheim, New York
- 20 Bertini, I. and Luchinat, C. (1996) Coordination Chemistry Reviews. Chapter 3 Relaxation. *Coordination Chemistry Reviews* **150**, 77–110
- 21 Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. and Lauffer, R. B. (1999) Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem Rev* **99**, 2293–2352
- 22 Solomon, I. (1955) Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys Rev* **99**, 559–565
- 23 Bloembergen, N. (1957) Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *J Chem Phys* **27**, 572–573
- 24 Caravan, P. (2006) Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem Soc Rev* **35**, 512–523
- 25 Abragam, A. (1961) *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford
- 26 Koenig, S. S. (1978) A novel derivation of the Solomon-Bloembergen-Morgan equations: Application to solvent relaxation by  $Mn^{2+}$ —Protein complexes. *Journal of Magnetic Resonance* **31**, 1–10
- 27 Koenig, S. (1982) A classical description of relaxation of interacting pairs of unlike spins: Extension to  $T1\rho$ ,  $T2$ , and  $T1\rho_{off}$ , including contact interactions. *Journal of Magnetic Resonance* **47**, 441–453
- 28 Holleman, A. F., Wiberg, E. and Wiberg, N. (2007) *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, de Gruyter, Berlin, New York
- 29 Caravan, P., Astashkin, A. V. and Raitsimring, A. M. (2003) The gadolinium(III)-water hydrogen distance in MRI contrast agents. *Inorg Chem* **42**, 3972–3974
- 30 Astashkin, A., Raitsimring, A. and Caravan, P. (2004) Pulsed ENDOR Study of Water Coordination to  $Gd^{3+}$  Complexes in Orientationally Disordered Systems. *J Phys Chem A* **108**, 1990–2001
- 31 Vishnevskaya, G. P. and Kozyrev B.M. (1966) Effect of solvent on the paramagnetic relaxation constants in liquid solutions of gadolinium nitrate. *Journal of Structural Chemistry* **7**, 20–24
- 32 Hudson A. and Lewis J.W.E. (1970) Electron spin relaxation of  $8S$  ions in solution. *Transactions of the Faraday Society* **66**, 1297–1301
- 33 Koenig, S. H. (1991) From the relaxivity of  $Gd(DTPA)_2^-$  to everything else. *Magn Reson Med* **22**, 183–190

- 34 Hernandez, G., Bryant RG and Tweedle, M. F. (1990) Proton magnetic relaxation dispersion in aqueous glycerol solutions of Gd(DTPA)<sup>2-</sup> and Gd(DOTA)<sup>-</sup>. *Inorganic Chemistry* **29**, 5109–5113
- 35 Bloembergen, N. and Morgan, L. (1961) Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *The Journal of Chemical Physics* **34**, 842–850
- 36 Swift, T. and Connick, R. (1962) NMR-Relaxation Mechanisms of O<sup>17</sup> in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *J Chem Phys* **37**, 307–320
- 37 Luz, Z. and Meiboom S. (1964) Proton Relaxation in Dilute Solutions of Cobalt(II) and Nickel(II) Ions in Methanol and the Rate of Methanol Exchange of the Solvation Sphere. *J Chem Phys* **40**, 2686–2692
- 38 Borel, A., Helm, L. and Merbach, A. E. (2001) Molecular dynamics simulations of MRI-relevant GdIII chelates: direct access to outer-sphere relaxivity. *Chemistry* **7**, 600–610
- 39 Caravan, P. (2009) Protein-targeted gadolinium-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents: design and mechanism of action. *Acc. Chem. Res.* **42**, 851–862
- 40 Bellin, M.-F. (2006) MR contrast agents, the old and the new. *Eur J Radiol* **60**, 314–323
- 41 Laurent, S., Elst, L. V. and Muller, R. N. (2006) Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging* **1**, 128–137
- 42 Caravan, P., Farrar, C. T., Frullano, L. and Uppal, R. (2009) Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T<sub>1</sub> contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging* **4**, 89–100
- 43 Dumas, S., Jacques, V., Sun, W.-C., Troughton, J. S., Welch, J. T., Chasse, J. M., Schmitt-Willich, H. and Caravan, P. (2010) High relaxivity magnetic resonance imaging contrast agents. Part 1. Impact of single donor atom substitution on relaxivity of serum albumin-bound gadolinium complexes. *Invest Radiol* **45**, 600–612
- 44 Caravan, P. and Zhang, Z. (2012) Structure - relaxivity relationships among targeted MR contrast agents. *European journal of inorganic chemistry* **2012**, 1916–1923
- 45 Wiener, E. C., Konda, S., Shadron, A., Brechbiel, M. and Gansow, O. (1997) Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol* **32**, 748–754
- 46 Konda, S. D., Aref, M., Wang, S., Brechbiel, M. and Wiener, E. C. (2001) Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumor xenografts. *MAGMA* **12**, 104–113
- 47 Oyewumi, M. O., Yokel, R. A., Jay, M., Coakley, T. and Mumper, R. J. (2004) Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Control Release* **95**, 613–626
- 48 Gunanathan, C., Pais, A., Furman-Haran, E., Seger, D., Eyal, E., Mukhopadhyay, S., Ben-David, Y., Leitun, G., Cohen, H. and Vilan, A. et al. (2007) Water-soluble contrast agents targeted at the estrogen receptor for molecular magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem* **18**, 1361–1365

- 49 Li, M.-J., Greenblatt, H. M., Dym, O., Albeck, S., Pais, A., Gunanathan, C., Milstein, D., Degani, H. and Sussman, J. L. (2011) Structure of estradiol metal chelate and estrogen receptor complex: the basis for designing a new class of selective estrogen receptor modulators. *J Med Chem* **54**, 3575–3580
- 50 Prantner, A. M., Sharma, V., Garbow, J. R. and Piwnica-Worms, D. (2003) Synthesis and characterization of a Gd-DOTA-D-permeation peptide for magnetic resonance relaxation enhancement of intracellular targets. *Mol Imaging* **2**, 333–341
- 51 Bullok, K. E., Gammon, S. T., Violini, S., Prantner, A. M., Villalobos, V. M., Sharma, V. and Piwnica-Worms, D. (2006) Permeation peptide conjugates for in vivo molecular imaging applications. *Mol Imaging* **5**, 1–15
- 52 Brandwijk, R. J. M. G. E., Mulder, W. J. M., Nicolay, K., Mayo, K. H., Thijssen, V. L. J. L. and Griffioen, A. W. (2007) Anginex-conjugated liposomes for targeting of angiogenic endothelial cells. *Bioconjug Chem* **18**, 785–790
- 53 Park, J.-A., Lee, J.-J., Jung, J.-C., Yu, D.-Y., Oh, C., Ha, S., Kim, T.-J. and Chang, Y. (2008) Gd-DOTA conjugate of RGD as a potential tumor-targeting MRI contrast agent. *Chembiochem* **9**, 2811–2813
- 54 Wei, L., Li, S., Yang, J., Ye, Y., Zou, J., Wang, L., Long, R., Zurkiya, O., Zhao, T. and Johnson, J. et al. (2011) Protein-based MRI contrast agents for molecular imaging of prostate cancer. *Mol Imaging Biol* **13**, 416–423
- 55 Li, K. C. P. and Bednarski, M. D. (2002) Vascular-targeted molecular imaging using functionalized polymerized vesicles. *J Magn Reson Imaging* **16**, 388–393
- 56 Mulder, W. J. M., Strijkers, G. J., Griffioen, A. W., van Bloois, L., Molema, G., Storm, G., Koning, G. A. and Nicolay, K. (2004) A liposomal system for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of molecular targets. *Bioconjug Chem* **15**, 799–806
- 57 Erdogan, S., Medarova, Z. O., Roby, A., Moore, A. and Torchilin, V. P. (2008) Enhanced tumor MR imaging with gadolinium-loaded polychelating polymer-containing tumor-targeted liposomes. *J Magn Reson Imaging* **27**, 574–580
- 58 Koole, R., van Schooneveld, M. M., Hilhorst, J., Castermans, K., Cormode, D. P., Strijkers, G. J., Mello Donegá, C. de, Vanmaekelbergh, D., Griffioen, A. W. and Nicolay, K. et al. (2008) Paramagnetic lipid-coated silica nanoparticles with a fluorescent quantum dot core: a new contrast agent platform for multimodality imaging. *Bioconjug Chem* **19**, 2471–2479
- 59 Qiao, J., Li, S., Wei, L., Jiang, J., Long, R., Mao, H., Wei, L., Wang, L., Yang, H. and Grossniklaus, H. E. et al. (2011) HER2 targeted molecular MR imaging using a de novo designed protein contrast agent. *PLoS One* **6**, e18103
- 60 Leung K. (2012) ZHER2:342 Affibody-polyethylene glycol-superparamagnetic iron oxide nanoparticles. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109343/>
- 61 Spuentrup, E., Buecker, A., Katoh, M., Wiethoff, A. J., Parsons, E. C., JR, Botnar, R. M., Weisskoff, R. M., Graham, P. B., Manning, W. J. and Gunther, R. W. (2005) Molecular magnetic resonance imaging of coronary thrombosis and pulmonary emboli with a novel fibrin-targeted contrast agent. *Circulation* **111**, 1377–1382
- 62 Zhang, Z., Greenfield, M. T., Spiller, M., McMurry, T. J., Lauffer, R. B. and Caravan, P. (2005) Multilocus binding increases the relaxivity of protein-bound MRI contrast agents. *Angew. Chem Int Ed Engl* **44**, 6766–6769

- 63 Aime, S., Castelli, D. D., Crich, S. G., Gianolio, E. and Terreno, E. (2009) Pushing the sensitivity envelope of lanthanide-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for molecular imaging applications. *Acc Chem Res* **42**, 822–831
- 64 Kamaly, N., Miller, A. D. and Bell, J. D. (2010) Chemistry of tumour targeted T1 based MRI contrast agents. *Curr Top Med Chem* **10**, 1158–1183
- 65 Tilcock, C., Unger, E., Cullis, P. and MacDougall, P. (1989) Liposomal Gd-DTPA: preparation and characterization of relaxivity. *Radiology* **171**, 77–80
- 66 Unger, E., Tilcock, C., Ahkong, Q. F. and Fritz, T. (1990) Paramagnetic liposomes as magnetic resonance contrast agents. *Invest Radiol* **25 Suppl 1**, S65-6
- 67 Storrs, R. W., Tropper, F. D., Henry, Y. L., Song, C. K., Kuniyoshi, J. K., Sipkins, D. A., Li, K. C. and Bednarski, M. D. (1995) Paramagnetic Polymerized Liposomes: Synthesis, Characterization, and Applications for Magnetic Resonance Imaging. *J Am Chem Soc* **117**, 7301–7306
- 68 Oliver, M., Ahmad, A., Kamaly, N., Perouzel, E., Caussin, A., Keller, M., Herlihy, A., Bell, J., Miller, A. D. and Jorgensen, M. R. (2006) MAGfect: a novel liposome formulation for MRI labelling and visualization of cells. *Org Biomol Chem* **4**, 3489–3497
- 69 Kamaly, N., Kalber, T., Ahmad, A., Oliver, M. H., So, P.-W., Herlihy, A. H., Bell, J. D., Jorgensen, M. R. and Miller, A. D. (2008) Bimodal paramagnetic and fluorescent liposomes for cellular and tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem* **19**, 118–129
- 70 André, J., Tóth, E., Fischer, H., Seelig, A., Mäcke, H. and Merbach, A. E. (1999) High Relaxivity for Monomeric Gd(DOTA)-Based MRI Contrast Agents, Thanks to Micellar Self-Organization. *Chemistry - A European Journal* **5**, 2977–2983
- 71 Mulder, W. J. M., Strijkers, G. J., Briley-Saboe, K. C., Frias, J. C., Aguinaldo, J. G. S., Vucic, E., Amirbekian, V., Tang, C., Chin, P. T. K. and Nicolay, K. et al. (2007) Molecular imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using bimodal PEG-micelles. *Magn Reson Med* **58**, 1164–1170
- 72 Vaccaro, M., Accardo, A., D'Errico, G., Schillen, K., Radulescu, A., Tesauero, D., Morelli, G. and Paduano, L. (2007) Peptides and Gd complexes containing colloidal assemblies as tumor-specific contrast agents in MRI: physicochemical characterization. *Biophys J* **93**, 1736–1746
- 73 Zhang, G., Zhang, R., Wen, X., Li, L. and Li, C. (2008) Micelles based on biodegradable poly(L-glutamic acid)-b-polylactide with paramagnetic Gd ions chelated to the shell layer as a potential nanoscale MRI-visible delivery system. *Biomacromolecules* **9**, 36–42
- 74 Flacke, S., Fischer, S., Scott, M. J., Fuhrhop, R. J., Allen, J. S., McLean, M., Winter, P., Sicard, G. A., Gaffney, P. J. and Wickline, S. A. et al. (2001) Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation* **104**, 1280–1285
- 75 Desser, T. S., Rubin, D. L., Muller, H. H., Qing, F., Khodor, S., Zanazzi, G., Young, S. W., Ladd, D. L., Wellons, J. A. and Kellar, K. E. (1994) Dynamics of tumor imaging with Gd-DTPA-polyethylene glycol polymers: dependence on molecular weight. *J Magn Reson Imaging* **4**, 467–472



- 76 Vexler, V. S., Clement, O., Schmitt-Willich, H. and Brasch, R. C. (1994) Effect of varying the molecular weight of the MR contrast agent Gd-DTPA-polylysine on blood pharmacokinetics and enhancement patterns. *J Magn Reson Imaging* **4**, 381–388
- 77 Casali, C., Janier, M., Canet, E., Obadia, J. F., Benderbous, S., Corot, C. and Revel, D. (1998) Evaluation of Gd-DOTA-labeled dextran polymer as an intravascular MR contrast agent for myocardial perfusion. *Acad Radiol* **5 Suppl 1**, S214-8
- 78 Wiener, E., Brechbiel, M., Brothers, H., Magin, R., Gansow O.A., Tomalia, D. and Lauterbur, P. (1994) Dendrimer-based metal chelates: A new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine* **31**, 1–8
- 79 Xu, H., Regino, C. A. S., Bernardo, M., Koyama, Y., Kobayashi, H., Choyke, P. L. and Brechbiel, M. W. (2007) Toward improved syntheses of dendrimer-based magnetic resonance imaging contrast agents: new bifunctional diethylenetriaminepentaacetic acid ligands and nonaqueous conjugation chemistry. *J Med Chem* **50**, 3185–3193
- 80 Swanson, S. D., Kukowska-Latallo, J. F., Patri, A. K., Chen, C., Ge, S., Cao, Z., Kotlyar, A., East, A. T. and Baker, J. R. (2008) Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int J Nanomedicine* **3**, 201–210
- 81 Luo, K., Liu, G., He, B., Wu, Y., Gong, Q., Song, B., Ai, H. and Gu, Z. (2011) Multifunctional gadolinium-based dendritic macromolecules as liver targeting imaging probes. *Biomaterials* **32**, 2575–2585
- 82 Ye, M., Tang, J., Wang, X., Xu, J., Sui, M. and Shen, Y. (2011) Synthesis and characterization of a novel dendritic magnetic resonance imaging contrast agent. *J Control Release* **152 Suppl 1**, e256-7
- 83 Sitharaman, B. and Wilson, L. J. (2006) Gadonanotubes as new high-performance MRI contrast agents. *Int J Nanomedicine* **1**, 291–295
- 84 Tang, A. M., Ananta, J. S., Zhao, H., Cisneros, B. T., Lam, E. Y., Wong, S. T., Wilson, L. J. and Wong, K. K. (2011) Cellular uptake and imaging studies of gadolinium-loaded single-walled carbon nanotubes as MRI contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging* **6**, 93–99
- 85 Tran, L. A., Krishnamurthy, R., Muthupillai, R., Cabreira-Hansen, M. d. G., Willerson, J. T., Perin, E. C. and Wilson, L. J. (2010) Gadonanotubes as magnetic nanolabels for stem cell detection. *Biomaterials* **31**, 9482–9491
- 86 Debouttière, P., Roux, S., Vocanson, F., Billotey, C., Beuf, O., Favre-Réguillon, A., Lin, Y., Pellet-Rostaing, S., Lamartine, R. and Perriat, P. et al. (2006) Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Functional Materials* **16**, 2330–2339
- 87 Alric, C., Taleb, J., Le Duc, G., Mandon, C., Billotey, C., Le Meur-Herland, A., Brochard, T., Vocanson, F., Janier, M. and Perriat, P. et al. (2008) Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc* **130**, 5908–5915
- 88 Park, J.-A., Reddy, P. A. N., Kim, H.-K., Kim, I.-S., Kim, G.-C., Chang, Y. and Kim, T.-J. (2008) Gold nanoparticles functionalised by Gd-complex of DTPA-bis(amide) conjugate of glutathione as an MRI contrast agent. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 6135–6137

- 89 Moriggi, L., Cannizzo, C., Dumas, E., Mayer, C. R., Ulianov, A. and Helm, L. (2009) Gold nanoparticles functionalized with gadolinium chelates as high-relaxivity MRI contrast agents. *J Am Chem Soc* **131**, 10828–10829
- 90 Aime, S., Frullano, L. and Geninatti Crich, S. (2002) Compartmentalization of a gadolinium complex in the apoferritin cavity: a route to obtain high relaxivity contrast agents for magnetic resonance imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 1017–1019
- 91 Anderson, E. A., Isaacman, S., Peabody, D. S., Wang, E. Y., Canary, J. W. and Kirshenbaum, K. (2006) Viral nanoparticles donning a paramagnetic coat: conjugation of MRI contrast agents to the MS2 capsid. *Nano Lett* **6**, 1160–1164
- 92 Liepold, L., Anderson, S., Willits, D., Oltrogge, L., Frank, J. A., Douglas, T. and Young, M. (2007) Viral capsids as MRI contrast agents. *Magn Reson Med* **58**, 871–879
- 93 Liepold, L. O., Abedin, M. J., Buckhouse, E. D., Frank, J. A., Young, M. J. and Douglas, T. (2009) Supramolecular protein cage composite MR contrast agents with extremely efficient relaxivity properties. *Nano Lett* **9**, 4520–4526
- 94 Karfeld, L. S., Bull, S. R., Davis, N. E., Meade, T. J. and Barron, A. E. (2007) Use of a genetically engineered protein for the design of a multivalent MRI contrast agent. *Bioconjug Chem* **18**, 1697–1700
- 95 Port, M., Corot, C., Raynal, I., Idee, J. M., Dencausse, A., Lancelot, E., Meyer, D., Bonnemain, B. and Lautrou, J. (2001) Physicochemical and biological evaluation of P792, a rapid-clearance blood-pool agent for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* **36**, 445–454
- 96 Fulton, D. A., O'Halloran, M., Parker, D., Senanayake, K., Botta, M. and Aime, S. (2005) Efficient relaxivity enhancement in dendritic gadolinium complexes: effective motional coupling in medium molecular weight conjugates. *Chem Commun (Camb)*, 474–476
- 97 Yang, J. J., Yang, J., Wei, L., Zurkiya, O., Yang, W., Li, S., Zou, J., Zhou, Y., Maniccia, A. L. W. and Mao, H. et al. (2008) Rational design of protein-based MRI contrast agents. *J Am Chem Soc* **130**, 9260–9267
- 98 Lee, Y.-H., Tanner, J. J., Larson, J. D. and Henzl, M. T. (2004) Crystal structure of a high-affinity variant of rat alpha-parvalbumin. *Biochemistry* **43**, 10008–10017
- 99 Shannon, R. (1976) Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Cryst* **32**, 751–767
- 100 Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsen, L., Elmlblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T. A. and Uhlen, M. (1987) A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng* **1**, 107–113
- 101 Iijima, M., Kadoya, H., Hatahira, S., Hiramatsu, S., Jung, G., Martin, A., Quinn, J., Jung, J., Jeong, S.-Y. and Choi, E. K. et al. (2011) Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. *Biomaterials* **32**, 1455–1464
- 102 Deisenhofer, J. (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361–2370

- 103 Moks, T., Abrahmsén, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjöquist, J. and Uhlén, M. (1986) Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* **156**, 637–643
- 104 Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. and Parks, W. P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1417–1423
- 105 Neumann, D. (2006) Strukturelle und biochemische Charakterisierung der humanen PAPS-Synthetase 2. Diplomarbeit, Ruhruniversität Bochum, Deutschland
- 106 Gronwald, W. and Kalbitzer, H. R. (2010) Automated protein NMR structure determination in solution. *Methods Mol Biol* **673**, 95–127
- 107 Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J. and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* **59**, 687–696
- 108 Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. and Lopez, R. et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948
- 109 GraphPad Software, Inc., Graphpad prism 5.04
- 110 Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671–675
- 111 Kibbe, W. A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43-6
- 112 DeLano, W. (2009) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r1, Schrödinger, LLC
- 113 Walker, J., ed. (2005) The Proteomics Protocols Handbook. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, Humana Press
- 114 Fasman, G. D., ed. (1976) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Proteins, CRC Press, Cleveland, Ohio
- 115 Johnson, W. C. (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* **35**, 307–312
- 116 Sreerama, N. and Woody, R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* **209**, 32–44
- 117 Sreerama, N. and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**, 252–260
- 118 Kay, L., Keifer, P. and Saarinen, T. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc* **114**, 10663–10665
- 119 Palmer, A., Cavanagh, J., Wright, P. and Rance, M. (1991) Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) **93**, 151–170
- 120 Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S., Sorensen, O. and Griesinger, C. (1994). *J Biomol NMR* **4**, 301–306

- 121 Prasad, V., Semwogerere, D. and Weeks, E. R. (2007) Confocal microscopy of colloids. *J Phys: Condens Matter* **19**, 113102
- 122 Merbach, A. E. and Tóth, E., eds. (2001) *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. Photophysical Aspects of Lanthanide(III) Complexes*, Chichester, England
- 123 Riedel, E. (2004) *Anorganische Chemie*, W. de Gruyter, Berlin, New York
- 124 Richardson, F. S. (1982) Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chem Rev* **82**, 541–552
- 125 Kahle, H. and Kalbfleisch, H. (1962) Spektrum, Zeeman-Effekt und Elektronenterme des dreiwertigen Terbioms in kristallinen Salzen. *Zeitschrift für Physik A* **166**, 184–191
- 126 Horrocks, W., JR. and Sudnick, D. (1981) Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules. *Acc Chem Res* **14**, 384–392
- 127 Li, M. and Selvin, P. R. (1995) Luminescent Polyaminocarboxylate Chelates of Terbium and Europium: The Effect of Chelate Structure. *J Am Chem Soc* **117**, 8132–8138
- 128 Martell, A. E., Smith, R. M. and Motekaitis, R. J. NIST Standard Reference Database 46. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Version 8.0, NIST Standard Reference Data
- 129 Cheng, Y. and Prusoff, W. (1973) Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **22**, 3099–3108
- 130 Basu, G., Allen, M., Willits, D., Young, M. and Douglas, T. (2003) Metal binding to cowpea chlorotic mottle virus using terbium(III) fluorescence. *J Biol Inorg Chem* **8**, 721–725
- 131 Bernstein, M. A., King, K. F. and Zhou, X. J. (2004) *Handbook of MRI pulse sequences*. Chapter 14.2.1, Academic Press, Amsterdam, Boston
- 132 Schaeffer, H. and Jagow, G. von (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368–379
- 133 Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J. F., Harano, Y., Ioannidis, Y. E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D. and Miller, Z. et al. (2008) BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **36**, D402–8
- 134 Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *Eur J Biochem* **80**, 319–324
- 135 Zheng, D., Aramini, J. M. and Montelione, G. T. (2004) Validation of helical tilt angles in the solution NMR structure of the Z domain of Staphylococcal protein A by combined analysis of residual dipolar coupling and NOE data. *Protein Sci* **13**, 549–554
- 136 Henzl, M. T. and Tanner, J. J. (2008) Solution structure of Ca<sup>2+</sup>-free rat alpha-parvalbumin. *Protein Sci* **17**, 431–438
- 137 Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M. E., Bellot, F., Schlessinger, J. and Sela, M. (1988) Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **80**, 1605–1611

- 138 Cedergren, L., Andersson, R., Jansson, B., Uhlén, M. and Nilsson, B. (1993) Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Eng* **6**, 441–448
- 139 Braisted, A. C. and Wells, J. A. (1996) Minimizing a binding domain from protein A. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5688–5692
- 140 Starovasnik, M. A., Skelton, N. J., O'Connell, M. P., Kelley, R. F., Reilly, D. and Fairbrother, W. J. (1996) Solution structure of the E-domain of staphylococcal protein A. *Biochemistry* **35**, 15558–15569
- 141 Starovasnik, M. A., Braisted, A. C. and Wells, J. A. (1997) Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10080–10085
- 142 Masui, H., Castro, L. and Mendelsohn, J. (1993) Consumption of EGF by A431 cells: evidence for receptor recycling. *J Cell Biol* **120**, 85–93
- 143 Henzl, M. T., McCubbin, W. D., Kay, C. M. and Birnbaum, E. R. (1985) Luminescence studies of lanthanide ion binding to parvalbumin. *J Biol Chem* **260**, 8447–8455
- 144 Brittain, H. G., Richardson, F. S. and Martin, R. B. (1976) Terbium (III) emission as a probe of calcium(II) binding sites in proteins. *J Am Chem Soc* **98**, 8255–8260
- 145 Donato, H., JR and Martin, R. B. (1974) Conformations of carp muscle calcium binding parvalbumin. *Biochemistry* **13**, 4575–4579
- 146 Swain, A. L., Kretsinger, R. H. and Amma, E. L. (1989) Restrained least squares refinement of native (calcium) and cadmium-substituted carp parvalbumin using X-ray crystallographic data at 1.6-Å resolution. *J Biol Chem* **264**, 16620–16628
- 147 Eberhard, M. and Erne, P. (1994) Calcium and magnesium binding to rat parvalbumin. *Eur J Biochem* **222**, 21–26
- 148 Weisinger, J. R. and Bellorín-Font, E. (1998) Magnesium and phosphorus. *Lancet* **352**, 391–396
- 149 Schmidt, R., Lang, F. and Heckmann, M., eds. (2010) *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie; mit 85 Tabellen; mit herausnehmbaren Repetitorium; [Lehrbuch-medicin.de]*, Springer Medizin, Heidelberg
- 150 Zeptometrix Corporation (2009) Immuno-Tek Quantitative Human IgG ELISA (Data sheet). <http://www.zeptometrix.com/0801182.pdf>
- 151 Horrocks, W. and Sudnick, D. (1979) Lanthanide ion probes of structure in biology. Laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules. *J Am Chem Soc* **101**, 334–340
- 152 Bonnet, C. S., Fries, P. H., Crouzy, S., Sénèque, O., Cisnetti, F., Boturyn, D., Dumy, P. and Delangle, P. (2009) A gadolinium-binding cyclodecapeptide with a large high-field relaxivity involving second-sphere water. *Chemistry* **15**, 7083–7093
- 153 Bonnet, C. S., Fries, P. H., Gadelle, A., Gambarelli, S. and Delangle, P. (2008) A rigorous framework to interpret water relaxivity. The case study of a Gd(III) complex with an alpha-cyclodextrin derivative. *J Am Chem Soc* **130**, 10401–10413
- 154 Rheosense, I. Application Note: Viscosity measurement of a model protein solution of BSA. [http://www.rheosense.com/images/applicationsarticles/app-04\\_viscosity-of-bsa-in-pbs.pdf](http://www.rheosense.com/images/applicationsarticles/app-04_viscosity-of-bsa-in-pbs.pdf)

- 155 Ozbek, H., Fair, J. and Phillips, S. (1977) Viscosity Of Aqueous Sodium Chloride Solutions From 0 - 150 °C. <http://escholarship.org/uc/item/3jp6n2bf>
- 156 Pubanz, D., Gonzalez, G., Powell, H. D. and Merbach, A. E. (1995) Unexpectedly Large Change of Water Exchange Rate and Mechanism on [Ln(DTPA-BMA)(H<sub>2</sub>O)] Complexes along the Lanthanide(III) Series. *Inorg Chem* **34**, 4447–4453
- 157 Aime, S., Botta M., Fasano, M. and Terreno, E. (1999) Prototropic and Water-Exchange Processes in Aqueous Solutions of Gd(III) Chelates. *Accounts of Chemical Research* **32**, 941–949
- 158 Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J. and Cohen, S. (1978) Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 3317–3321
- 159 Kwok, T. T. and Sutherland, R. M. (1991) Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* **64**, 251–254
- 160 Frenzel, T., Lengsfeld, P., Schirmer, H., Hütter, J. and Weinmann, H.-J. (2008) Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C. *Invest Radiol* **43**, 817–828
- 161 Bottoms, C. A., Schuermann, J. P., Agah, S., Henzl, M. T. and Tanner, J. J. (2004) Crystal structure of rat alpha-parvalbumin at 1.05 Angstrom resolution. *Protein Sci* **13**, 1724–1734
- 162 Bonnet, C. S. and Tóth, E. (2010) Smart MR imaging agents relevant to potential neurologic applications. *AJNR Am J Neuroradiol* **31**, 401–409
- 163 Metzler, D., Metzler, C. and Sauke, D. (2001) *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells*, Academic Press

# Anhang

## Anhang A:

### Sequenzierung der Nukleotidsequenz von Zarvin nach Klonierung in den pET41\_Pre-Vektor durch die Firma Geneart (Regensburg)

```

                                ApaI
Template                        GTGGATAACAAATTTAACAAAGAAC
                                |||
Sequenzierung  ACTCCGCGGGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCGTGGATAACAAATTTAACAAAGAAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
Template  AGCAGAACGCGTTTTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACG
Sequenzierung  AGCAGAACGCGTTTTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACG
61  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  CGTTTATTCAGAGCCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGAAGCGA
Sequenzierung  CGTTTATTCAGAGCCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGAAGCGA
121  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  AAAAAGTGAACGATGCGCAGGCGCGCGAAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA
Sequenzierung  AAAAAGTGAACGATGCGCAGGCGCGCGAAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA
181  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  GCATGACCGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAAGCGATTGGCGCGTTTACCGCGG
Sequenzierung  GCATGACCGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAAGCGATTGGCGCGTTTACCGCGG
241  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  CGGATAGCTTTGATCATAAAAAATTTTTTCAGATGGTGGGCCTGAAAAAAAAAGCGCGG
Sequenzierung  CGGATAGCTTTGATCATAAAAAATTTTTTCAGATGGTGGGCCTGAAAAAAAAAGCGCGG
301  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  ATGATGTGAAAAAGTGTTCATATTCTGGATAAAGATAAAGATGGCTTTATTGATGAAG
Sequenzierung  ATGATGTGAAAAAGTGTTCATATTCTGGATAAAGATAAAGATGGCTTTATTGATGAAG
361  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  ATGAAGTGGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAGCGATGCGCGTGATCTGAGCGCGAAAG
Sequenzierung  ATGAAGTGGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAGCGATGCGCGTGATCTGAGCGCGAAAG
421  -----+-----+-----+-----+-----+
Template  AAACCAAAACCTGATGGCGCGGGCGATAAAGATGGCGATGGCAAAATTGGCGTGGAAG
Sequenzierung  AAACCAAAACCTGATGGCGCGGGCGATAAAGATGGCGATGGCAAAATTGGCGTGGAAG
481  -----+-----+-----+-----+-----+
                                BamHI
Template  AATTTAGCACCTGGTGGCGGAAAGCTAAT
Sequenzierung  AATTTAGCACCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGATCCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGCG
541  -----+-----+-----+-----+-----+

```

## Sequenzierungen nach Klonierung der separaten Z- und Parvalbumin-Domäne in den pET41\_Pre-Vektor

### Z-Domäne:

Template	AAAATCGGATGGTTCAACTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGCGGGTCT	60
Sequenzierung	GAGCTCATCGGAGGTCAGTGGTTCTGGTCT-CACCATCACCATCACTCCGCGGGTCT	59
	.*.**. . *. .*****: *****	
	ApaI	
Template	GGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCGTGGATAACAAATTTAACAAGAACAGCAGAACGCGTT	120
Sequenzierung	GGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCGTGGATAACAAATTTAACAAGAACAGCAGAACGCGTT	119
	*****	
Template	TTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAAGACAGCGTAACGCGTTTATTTCAGAG	180
Sequenzierung	TTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAAGACAGCGTAACGCGTTTATTTCAGAG	179
	*****	
Template	CCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGAAGCGAAAAAACTGAACGA	240
Sequenzierung	CCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGAAGCGAAAAAACTGAACGA	239
	*****	
	BamHI	
Template	TGCGCAGGCGCCGAAATAATGGATCCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGCGCCTGCAGGCG	300
Sequenzierung	TGCGCAGGCGCCGAAATAATGGATCCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGCGCCTGCAGGCG	299
	*****	

### Parvalbumin-Domäne:

Template	-----TCGGATGGTTCAACTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGCGGG	53
Sequenzierung	GAGCTCATCGGAGG--TTCAGTGGTTCTGGTCT-CACCATCACCATCACTCCGCGGG	57
	***** * * .*****: *****	
	ApaI	
Template	TCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCAGCATGACCGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAA	113
Sequenzierung	TCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCAGCATGACCGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAA	117
	*****	
Template	AAAAGCGATTGGCGCGTTTACCGCGCGGATAGCTTTGATCATAAAAAATTTTTCAGAT	173
Sequenzierung	AAAAGCGATTGGCGCGTTTACCGCGCGGATAGCTTTGATCATAAAAAATTTTTCAGAT	177
	*****	
Template	GGTGGGCCTGAAAAAAAAAAGCGCGGATGATGTGAAAAAAGTGTTCATATTCTGGATAA	233
Sequenzierung	GGTGGGCCTGAAAAAAAAAAGCGCGGATGATGTGAAAAAAGTGTTCATATTCTGGATAA	237
	*****	
Template	AGATAAAGATGGCTTTATTGATGAAGATGAACTGGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAG	293
Sequenzierung	AGATAAAGATGGCTTTATTGATGAAGATGAACTGGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAG	297
	*****	
Template	CGATGCGCGTGATCTGAGCGCGAAAGAAACCAAAACCCTGATGGCGGCGGGCGATAAAGA	353
Sequenzierung	CGATGCGCGTGATCTGAGCGCGAAAGAAACCAAAACCCTGATGGCGGCGGGCGATAAAGA	357
	*****	
	BamHI	
Template	TGGCGATGGCAAAATTGGCGTGGAAGAATTTAGCACCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGAT	413
Sequenzierung	TGGCGATGGCAAAATTGGCGTGGAAGAATTTAGCACCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGAT	417
	*****	
Template	CCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGCGCCTGCAGGCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC	473
Sequenzierung	CCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGCGCCTGCAGGCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC	477
	*****	

Die fehlenden Übereinstimmungen zu Beginn der Sequenzierungen ist auf eine niedrige Qualität letzterer an diesen Stellen zurückzuführen, was an den Rohdaten erkennbar ist, und spiegeln keine wirklichen Unstimmigkeiten wider.



## Sequenzierungen nach Einführen der Punktmutationen zur Herstellung von Zarvin-S146C und Zarvin-D72C

### Zarvin-S146C (Template: Zarvin-Wildtyp):

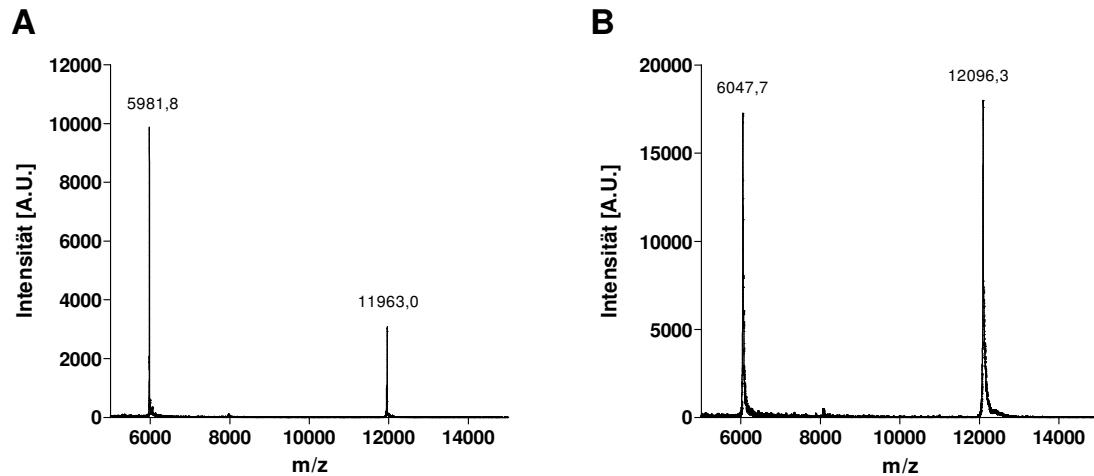
Template	-----	
Sequenzierung	TGGGTCACCAATCGGATGGTTCACTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGC	60
Template	-----	
Sequenzierung	GGGTCTGGAAGTCCTGTTCCAGGGGCGGTGGATAACAAATTTAACAAAGAACAGCAGAA	38 120
	*****	
Template	CGCGTTTTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACGCGTTTTAT	98
Sequenzierung	CGCGTTTTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACGCGTTTTAT	180
	*****	
Template	TCAGAGCCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGAAGCGAAAAAACT	158
Sequenzierung	TCAGAGCCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGAAGCGAAAAAACT	240
	*****	
Template	GAACGATGCGCAGGCGCCGAAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGAGCATGAC	218
Sequenzierung	GAACGATGCGCAGGCGCCGAAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGAGCATGAC	300
	*****	
Template	CGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAAGCGATTGGCGCGTTTACCGCGGCGGATAG	278
Sequenzierung	CGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAAGCGATTGGCGCGTTTACCGCGGCGGATAG	360
	*****	
Template	CTTTGATCATAAAAAATTTTTTCAGATGGTGGGCCTGAAAAAAAAAGCGCGGATGATGT	338
Sequenzierung	CTTTGATCATAAAAAATTTTTTCAGATGGTGGGCCTGAAAAAAAAAGCGCGGATGATGT	420
	*****	
Template	GAAAAAGTGTTTCATATTCTGGATAAAGATAAAGATGGCTTTATTGATGAAGATGAAC	398
Sequenzierung	GAAAAAGTGTTTCATATTCTGGATAAAGATAAAGATGGCTTTATTGATGAAGATGAAC	480
	*****	
Template	GGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAGCGATGCGCGTGATCTGAGCGGAAAGAAACCAA	458
Sequenzierung	GGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAGCGATGCGCGTGATCTGTGTGCGGAAAGAAACCAA	540
	***** * *****	
Template	AACCCTGATGGCGGCGGGCGATAAAGATGGCGATGGCAAAATTGGCGTGGAAGAATTTAG	518
Sequenzierung	AACCCTGATGGCGGCGGGCGATAAAGATGGCGATGGCAAAATTGGCGTGGAAGAATTTAG	600
	*****	
	BamHI	
Template	CACCCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGATCC-----	547
Sequenzierung	CACCCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGATCCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGGCCTGCAG	660
	*****	

**Zarvin-D72C (Template: Zarvin-Wildtyp):**

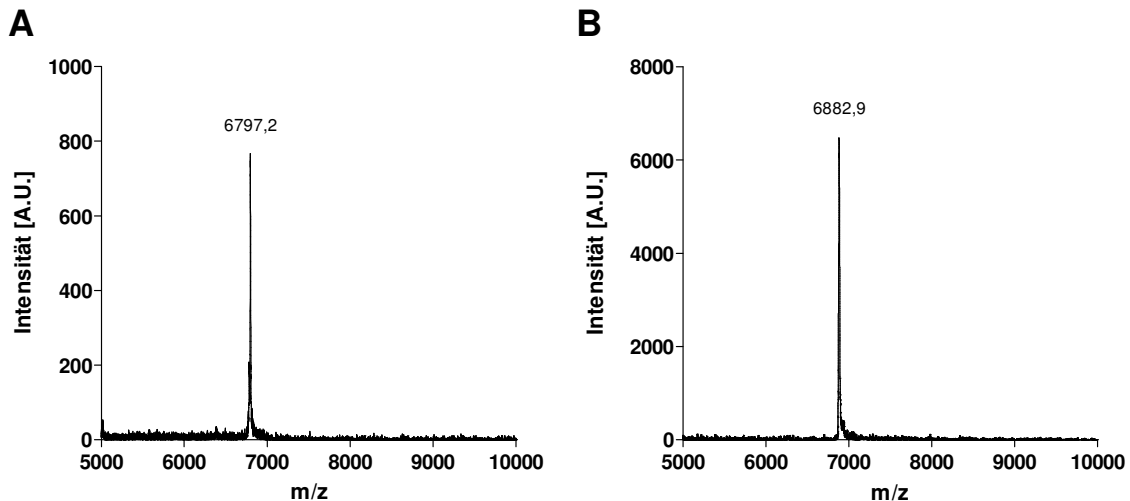
Template	-----	
Sequenzierung	CACCTTATTGGAAACGGCATACTCAACGGAGGTTCACTAGTGGTTCTGGTCTCACCATCA	60
Template	-----	
Sequenzierung	CCATCACTCCGCGGGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCGTGGATAACAAATTTAACAA	26 120
	*****	
Template	AGAACAGCAGAACGCGTTTTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAACAGCG	86
Sequenzierung	AGAACAGCAGAACGCGTTTTATGAAATTCTGCATCTGCCGAACCTGAACGAAGAACAGCG	180
	*****	
Template	TAACGCGTTTATTTCAGAGCCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGA	146
Sequenzierung	TAACGCGTTTATTTCAGAGCCTGAAAGATGATCCGAGCCAGAGCGCGAACCTGCTGGCGGA	240
	*****	
Template	AGCGAAAAAACTGAACGATGCGCAGGCGCCGAAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG	206
Sequenzierung	AGCGAAAAAACTGAACGATGCGCAGGCGCCGAAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG	300
	*****	
Template	CGGCAGCATGACCGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAAAAAGCGATTGGCGCGTTTAC	266
Sequenzierung	CGGCAGCATGACCGATCTGCTGAGCGCGGAAGATATTAAAAAGCGATTGGCGCGTTTAC	360
	*****	
Template	CGCGGCGGATAGCTTTGATCATAAAAAATTTTTTCAGATGGTGGGCCTGAAAAAAAAG	326
Sequenzierung	CGCGGCGGATAGCTTTGATCATAAAAAATTTTTTCAGATGGTGGGCCTGAAAAAAAAG	420
	*****	
Template	CGCGGATGATGTGAAAAAGTGTTTCATATTCTGGATAAAGATAAAGATGGCTTTATTGA	386
Sequenzierung	CGCGGATGATGTGAAAAAGTGTTTCATATTCTGGATAAAGATAAAGATGGCTTTATTGA	480
	*****	
Template	TGAAGATGAAGTGGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAGCGATGCGCGTGATCTGAGCGC	446
Sequenzierung	TGAAGATGAAGTGGGCAGCATTCTGAAAGGCTTTAGCAGCGATGCGCGTGATCTGAGCGC	540
	*****	
Template	GAAAGAAACCAAACCTGATGGCGGCGGCGATAAAGATGGCGATGGCAAAATTGGCGT	506
Sequenzierung	GAAAGAAACCAAACCTGATGGCGGCGGCGATAAAGATGGCGATGGCAAAATTGGCGT	600
	*****	
Template	-----	
Sequenzierung	GGAAGAATTTAGCACCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGATCC-----	547
	*****	
	GGAAGAATTTAGCACCTGGTGGCGGAAAGCTAATGGATCCGAATTCTGTACAGGCCTTG	660

## Anhang B:

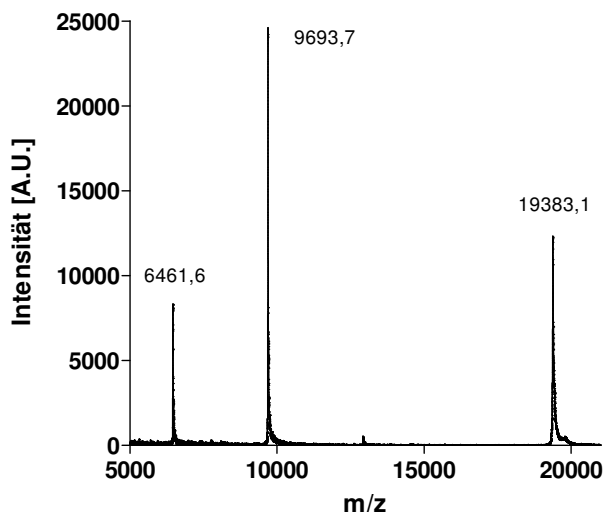
### MALDI-Massenspektren der gereinigten Z- und Parvalbumin-Domäne sowie der $^{15}\text{N}$ -markierten Proteinspezies



**Abb. B1:** MALDI-Massenspektren des gereinigten S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins der Ratte (**A**) sowie des entsprechenden  $^{15}\text{N}$ -markiert gereinigten Proteins (**B**). Sichtbar sind die einfach und die zweifach protonierten Massen der Proteine. Die erwartete einfach protonierte Masse des Parvalbumins liegt bei 11963,4 Da (Fehler: 33,4 ppm). Die erwartete einfach protonierte Masse des  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins liegt bei 12097,9 Da (Fehler: 132,3 ppm).



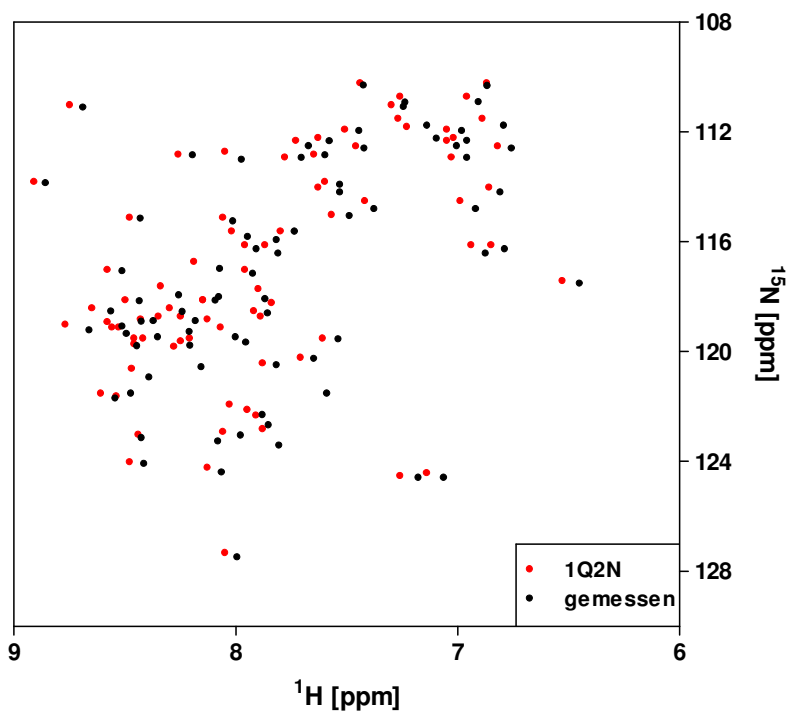
**Abb. B2:** MALDI-Massenspektren der gereinigten Z-Domäne (**A**) sowie des entsprechenden  $^{15}\text{N}$ -markiert gereinigten Proteins (**B**). Sichtbar sind die einfach protonierten Massen der Proteine. Die erwartete einfach protonierte Masse der Z-Domäne liegt bei 6795,5 Da (Fehler: 250,2 ppm). Die erwartete einfach protonierte Masse des  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins liegt bei 6879,2 Da (Fehler: 537,9 ppm).



**Abb. B3:** MALDI-Massenspektrum des  $^{15}\text{N}$ -markiert gereinigten Zarvins. Sichtbar sind die einfach, zweifach und dreifach protonierten Massen des Proteins. Die erwartete einfach protonierte Masse des  $^{15}\text{N}$ -markierten Zarvins liegt bei 19384,3 Da (Fehler: 10,3 ppm).

## Anhang C:

**Vergleich des gemessenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums der  $^{15}\text{N}$ -markiert gereinigten Z-Domäne mit den chemischen Verschiebungen der publizierten NMR-Struktur 1Q2N**

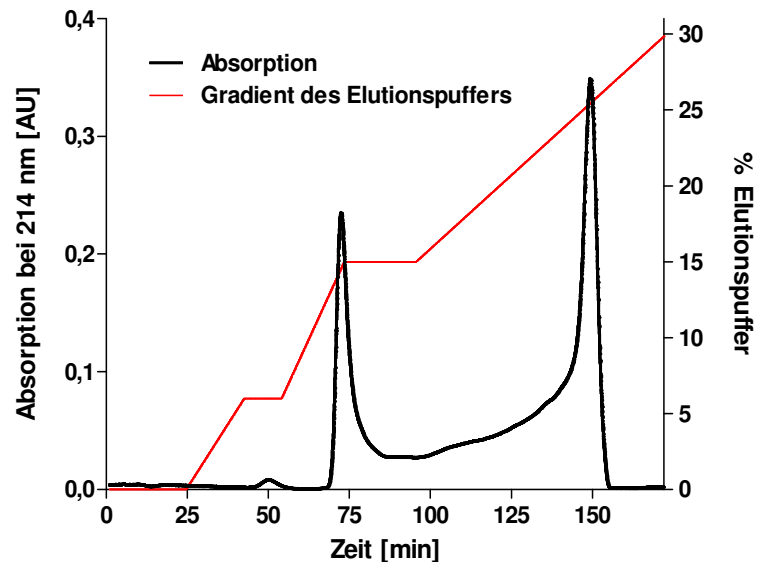


**Abb. C:** Der Vergleich zwischen den chemischen Verschiebungen des gemessenen Spektrums und der publizierten NMR-Struktur zeigt nur wenige leichte Unterschiede, welche auf die Verwendung unterschiedlicher Messpuffer zurückzuführen sind. Die gereinigte Z-Domäne ist somit korrekt gefaltet und das gemessene  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektrum erlaubt den Vergleich mit Signalen des Zarvins zur Überprüfung der korrekten Faltung der Z-Domäne innerhalb von Zarvin.

## Anhang D:

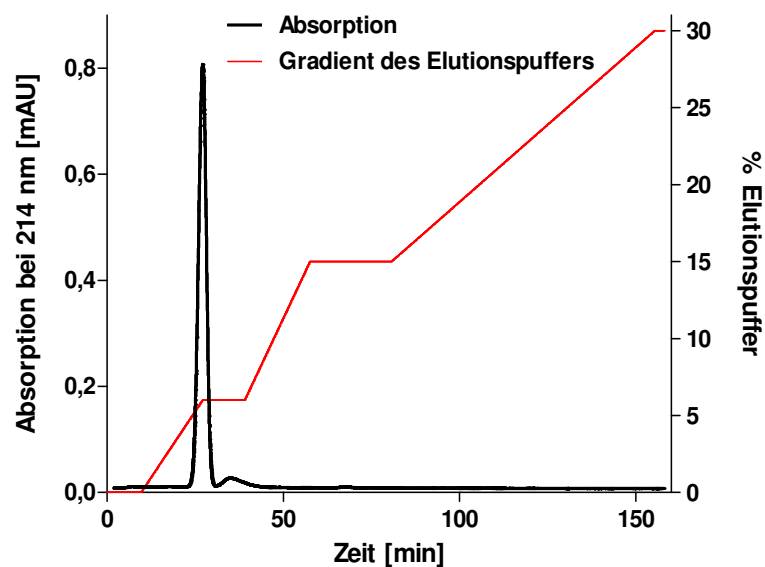
### Anionenaustausch-Chromatographie von Zarvin und der Z-Domäne

#### Zarvin:



**Abb. D1:** Anionenaustausch-Chromatographie des Zarvins mit Hilfe einer Q-Sepharose-Säule. Analog zu dem separaten S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumin existieren zwei verschiedene Spezies des Proteins in Lösung, die mittels Anionenaustausch-Chromatographie getrennt werden können. Theoretischer isoelektrischer Punkt des Zarvins (entsprechend der Primärsequenz): 4,94. Auftragspuffer: 20 mM Tris, pH 8,0 bei 4 °C. Elutionspuffer: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C.

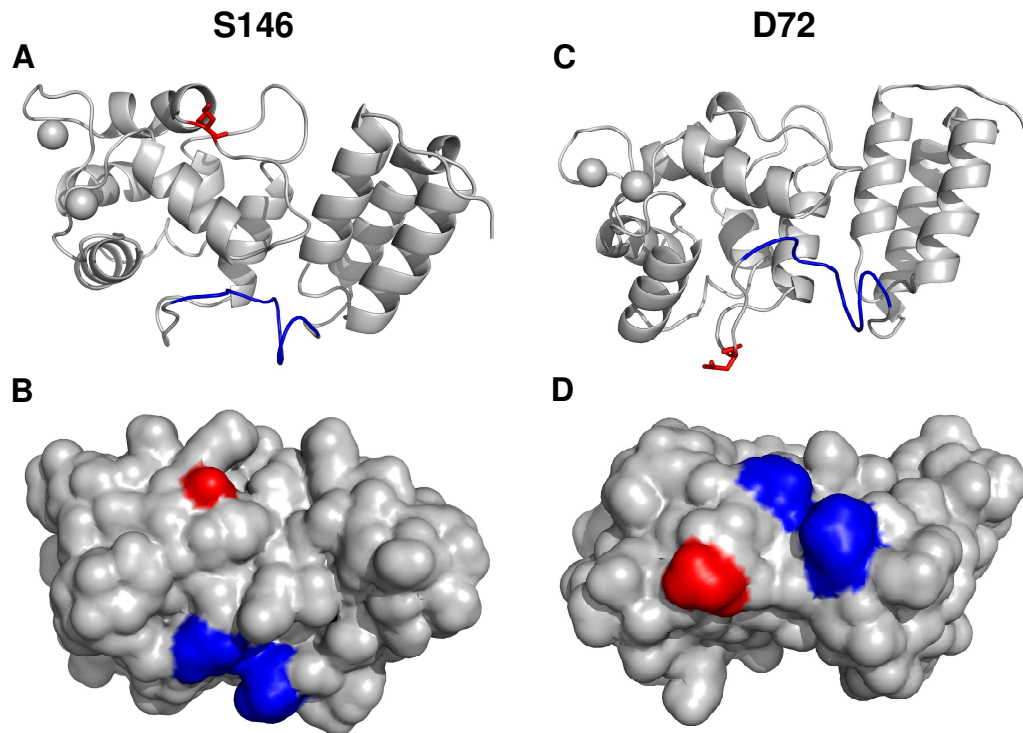
#### Z-Domäne:



**Abb. D2:** Anionenaustausch-Chromatographie der Z-Domäne mit Hilfe einer Q-Sepharose-Säule. Theoretischer isoelektrischer Punkt des Z-Domäne (entsprechend der Primärsequenz): 5,16. Auftragspuffer: 20 mM Tris, pH 8,0 bei 4 °C. Elutionspuffer: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C.

## Anhang E:

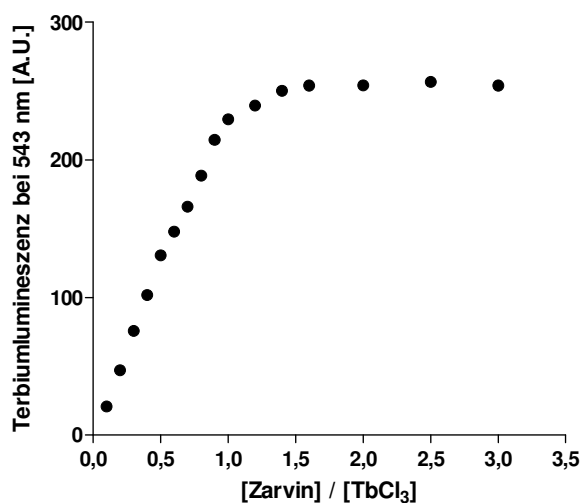
**Lokalisierung der Aminosäurepositionen S146 und D72 innerhalb des Zarvin-Proteins, welche jeweils zu einem Cystein mutiert wurden (S146C und D72C-Mutanten)**



**Abb. G:** **A, B:** Cartoon-Darstellung sowie Darstellung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche von Zarvin mit Lokalisierung der Aminosäure S146. **C, D:** Cartoon-Darstellung sowie Darstellung der Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche von Zarvin mit Lokalisierung der Aminosäure D72. **D** ist gegenüber **C** leicht gedreht zur jeweils besseren Übersichtlichkeit. Blau: Dekaglycin-Linker.

## Anhang F:

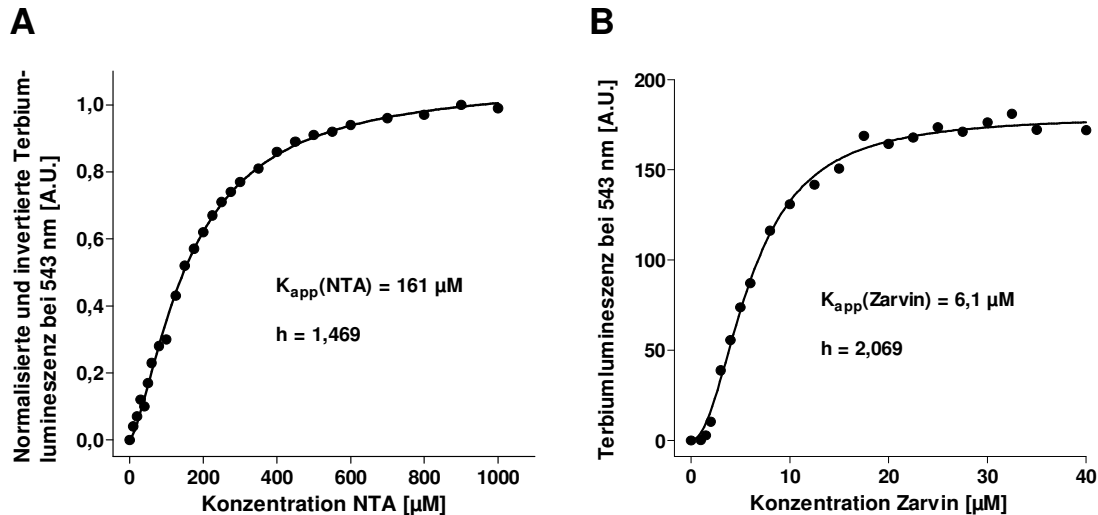
### Titration von $\text{TbCl}_3$ mit Zarvin



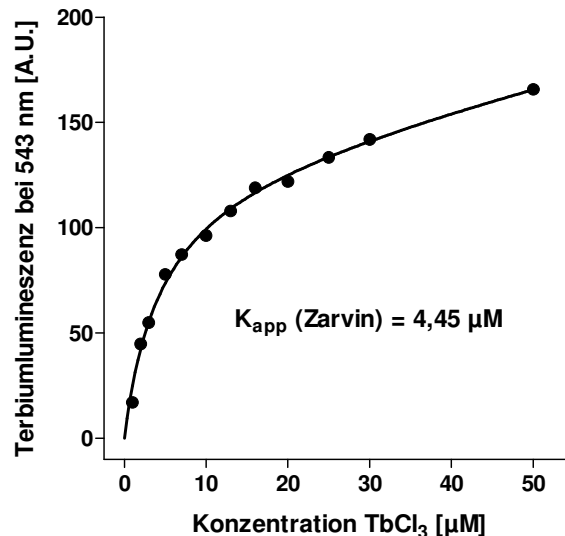
**Abb. F:** Titration von 5  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  mit Zarvin. Die Terbiumlumineszenz bei 543 nm nimmt auch oberhalb der Stöchiometrie von Zarvin zu  $\text{Tb}^{3+}$  von 1:2 (2,5  $\mu\text{M}$  Zarvin) weiter zu. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Metallionen höher affin bindende EF-Bindestelle zunehmend  $\text{Tb}^{3+}$  aus der CD-Bindestelle zieht. Da die EF-Bindestelle mit gebundenem  $\text{Tb}^{3+}$  einen höheren Beitrag zu der Lumineszenzintensität bei 543 nm leistet, als die CD-Bindestelle (siehe Abb. 3.18), nimmt auch die Lumineszenzintensität mit zunehmender Zarvin-Konzentration zu. Ab einem Konzentrationsverhältnis von Zarvin zu  $\text{Tb}^{3+}$  von etwa 1,6 befindet sich die Terbiumlumineszenz in der Sättigung und damit das gesamte  $\text{Tb}^{3+}$  in der EF-Bindestelle.

## Anhang G:

### Nichtlineare Regressionen der Titrations zur Messung der Bindungsaffinität von Zarvin und $\text{Tb}^{3+}$



**Abb. G1:** **A:** Normalisierung und Invertierung der Datenpunkte in Abb. 3.19A mit anschließender nichtlinearer Regression mittels der Hill-Gleichung. Der apparente  $K_D$ -Wert für NTA entspricht sehr gut dem globalen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von etwa  $160 \mu\text{M}$ . **B:** Nichtlineare Regression mit den Datenpunkten aus Abb. 3.19B. Auch hier entspricht der  $K_{\text{app}}$ -Wert dem globalen  $\text{IC}_{50}$ -Wert.  $h$ : Hill-Koeffizient.



**Abb. G2:** Titration von  $3 \mu\text{M}$  Zarvin und  $100 \mu\text{M}$  NTA mit  $\text{TbCl}_3$ . Der Komplex aus  $\text{Tb}^{3+}$  und Zarvin wurde bei  $258 \text{ nm}$  angeregt und die Lumineszenzintensität bei  $543 \text{ nm}$  gemessen. Die Summe einer Hyperbel und eines linearen Terms wurde mittels nichtlinearer Regression in die Daten eingepasst ( $R^2 = 0,9946$ ). Der lineare Beitrag zu der Lumineszenz bei  $543 \text{ nm}$  ist ein Resultat des auch bei  $258 \text{ nm}$  noch leicht anregbaren Komplexes  $\text{NTA}:\text{Tb}^{3+}$ , was sich bei höheren  $\text{TbCl}_3$ -Konzentrationen bemerkbar macht. Der  $K_{\text{app}}$ -Wert müsste bei dieser Titrationsmethode noch genauer bestimmt werden, indem eine geringere Zarvin-Konzentration vorgelegt wird. Der  $K_{\text{app}}$ -Wert liegt bei dieser Titration zu dicht bei der vorgelegten Konzentration von  $3 \mu\text{M}$ . Dennoch liegt der  $K_{\text{app}}$ -Wert in derselben Größenordnung wie bei der Titration in Abb. 3.19 (bzw. Abb. G1B) und bestätigt ebenfalls die berechnete Größenordnung für die Affinität der Bindung von  $\text{Tb}^{3+}$  an Zarvin.



## Anhang H:

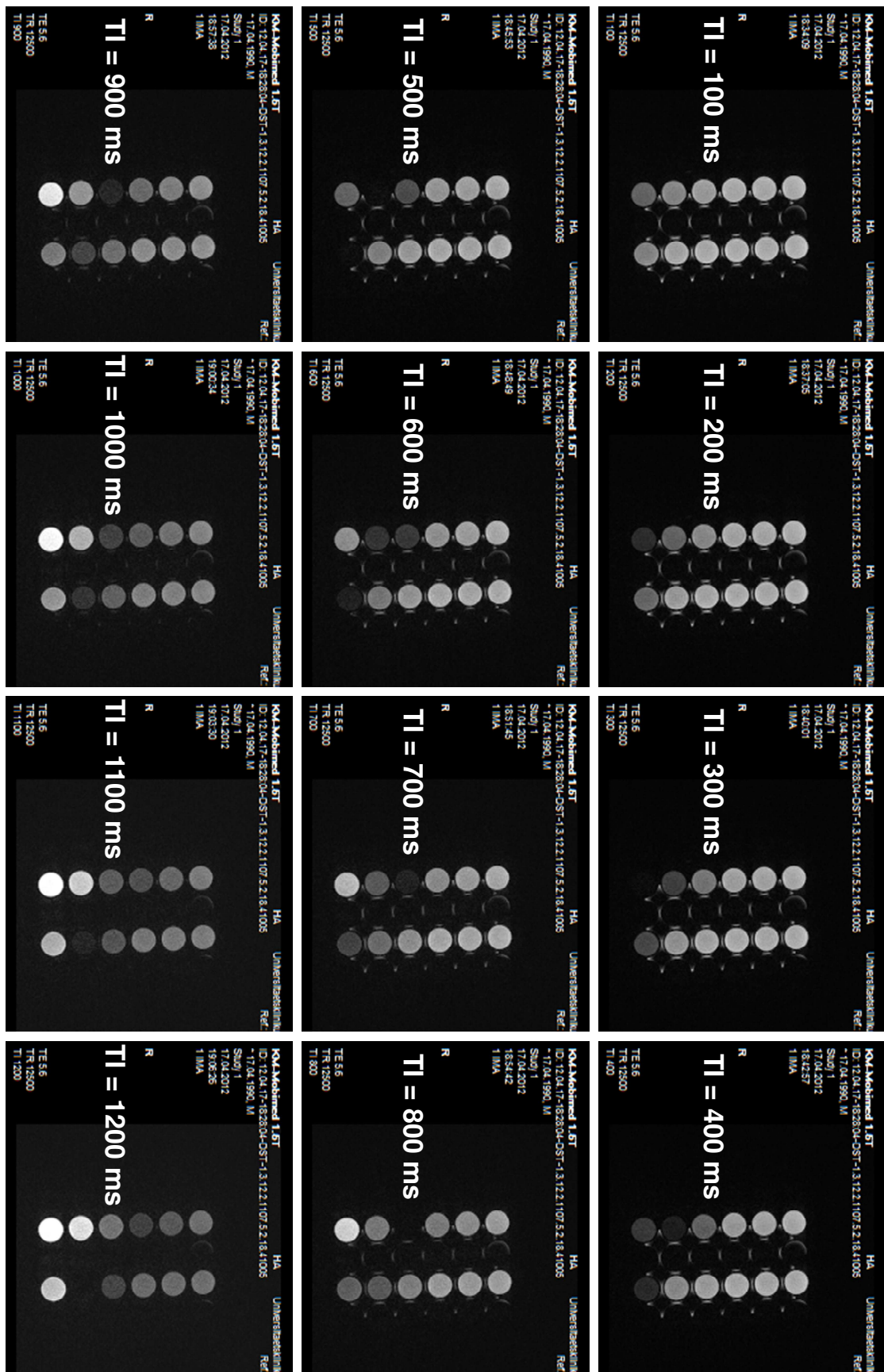
**MRT-Aufnahmen der Verdünnungsreihen von Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> und Cetuximab:Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> zur Ermittlung der TI<sub>0</sub>-Zeiten der einzelnen Verdünnungsstufen**

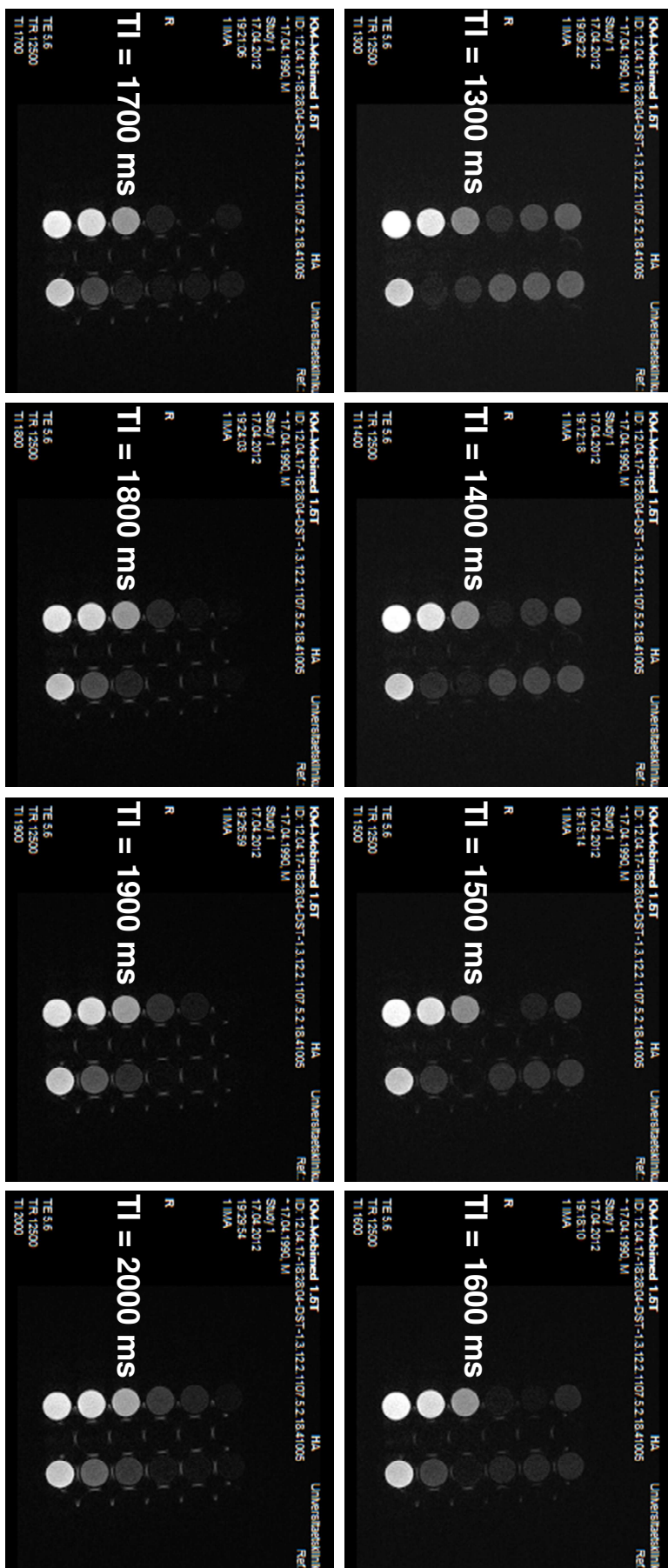
**Orientierung der einzelnen Verdünnungsstufen auf den Aufnahmen (siehe auch Abb. 3.22):**

<u>Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub></u>	<u>Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> mit Cetuximab</u>
0 µM	0,02 µM
0,5 µM	0,1 µM
1 µM	0,2 µM
5 µM	1 µM
10 µM	2 µM
20 µM	10 µM

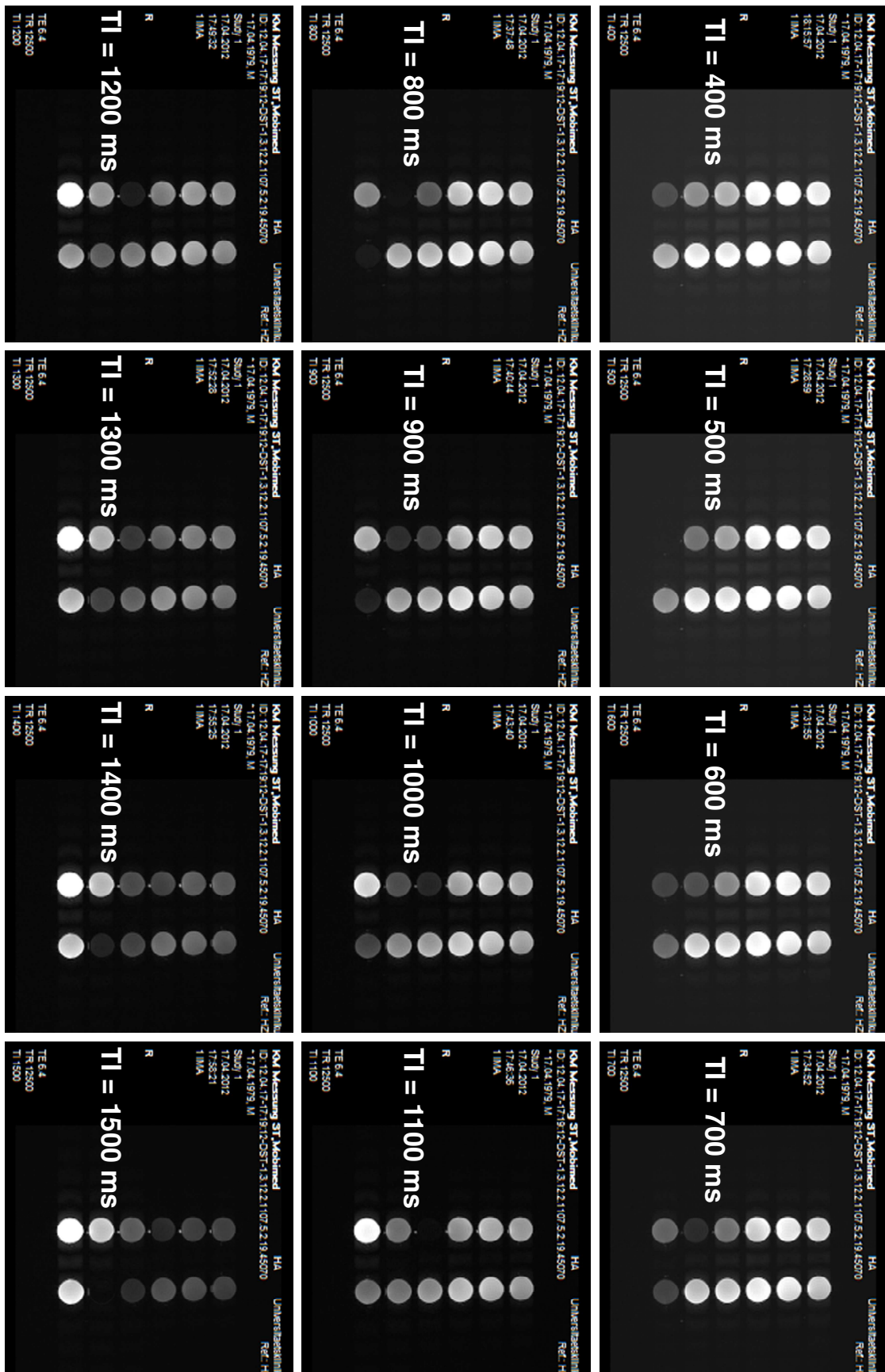
Die MRT-Aufnahmen zeigen beide Verdünnungsreihen entsprechend der Orientierung in der Tabelle (Aufnahmen sind im Querformat dargestellt). Die Konzentrationen beziehen sich in beiden Spalten auf Zarvin:(Gd<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>. In der rechten Spalte befindet sich in den Proben zusätzlich Cetuximab mit einer jeweils halb so hohen Konzentration entsprechend der Bindungsstöchiometrie. Die TI<sub>0</sub>-Zeit einer Verdünnungsstufe wurde bei derjenigen Inversionszeit TI abgelesen bzw. zwischen TI-Zeiten interpoliert, bei der bzw. zwischen denen die entsprechende Verdünnungsstufe schwarz erscheint.

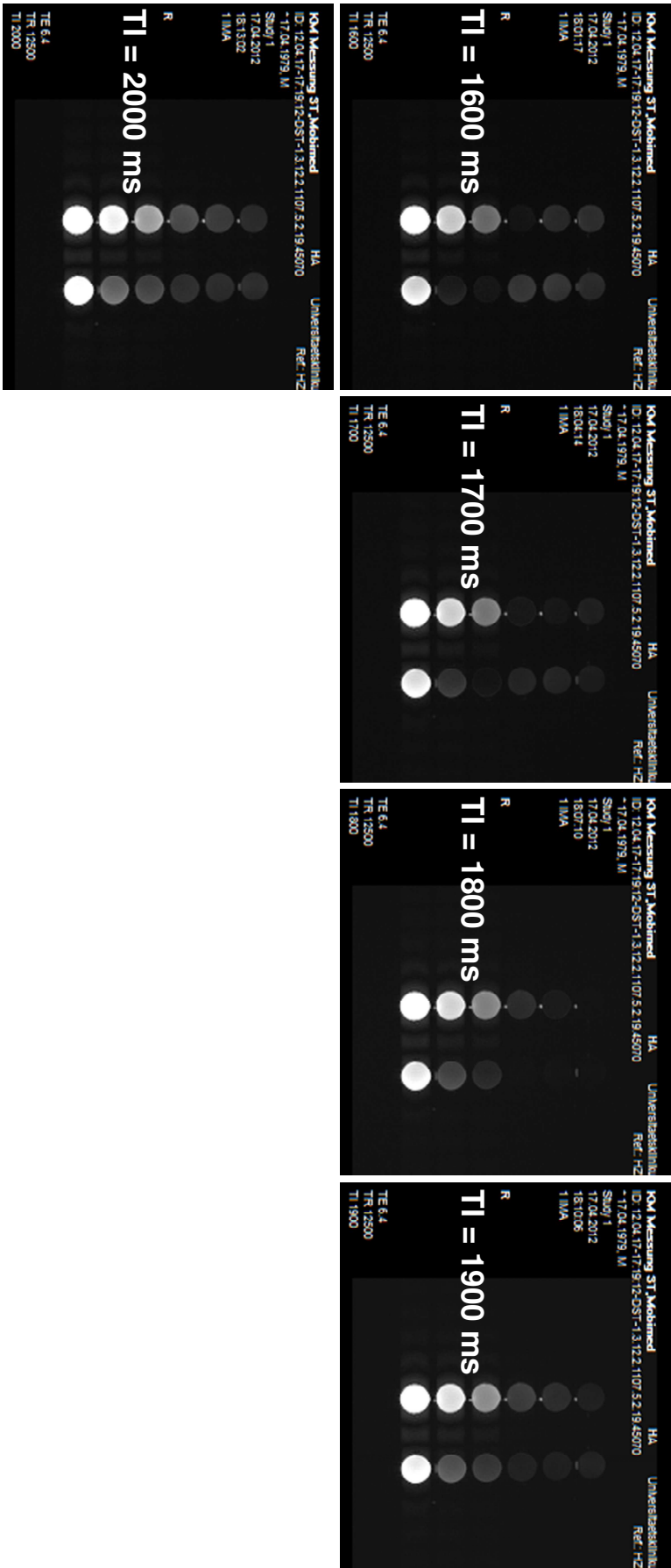
## MRT-Aufnahmen bei 1,5 Tesla:





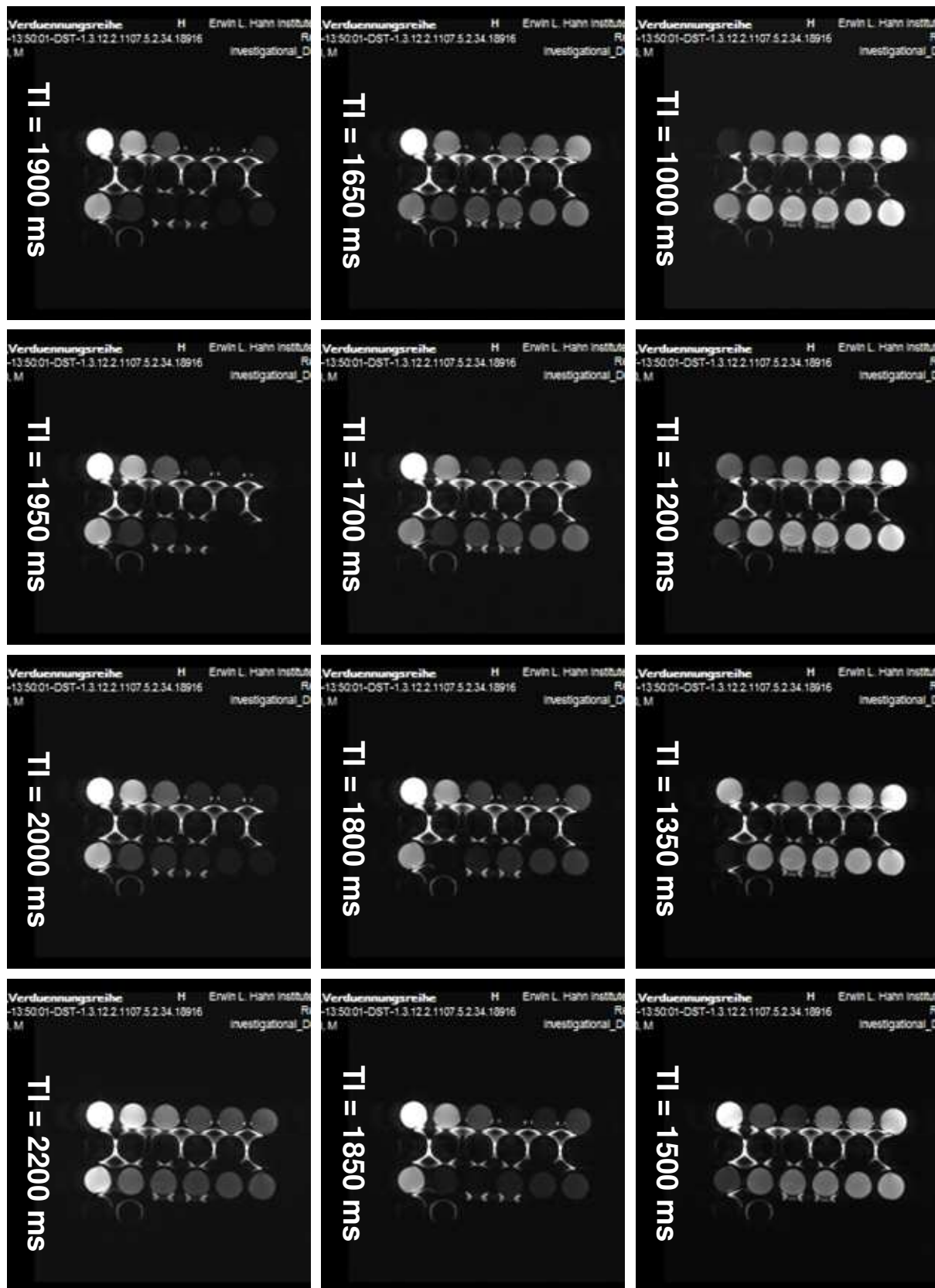
## MRT-Aufnahmen bei 3 Tesla:





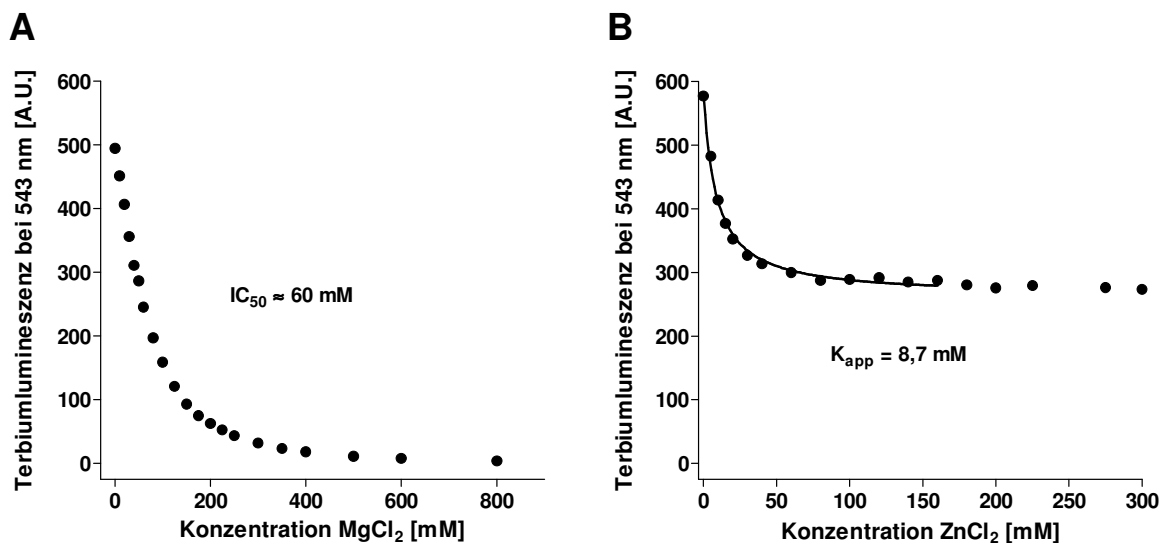


## MRT-Aufnahmen bei 7 Tesla:



## Anhang I:

### Kompetitionstitrations zur Abschätzung der apparenten $K_D$ -Werte von $Mg^{2+}$ und $Zn^{2+}$ bei der Verdrängung von $Tb^{3+}$

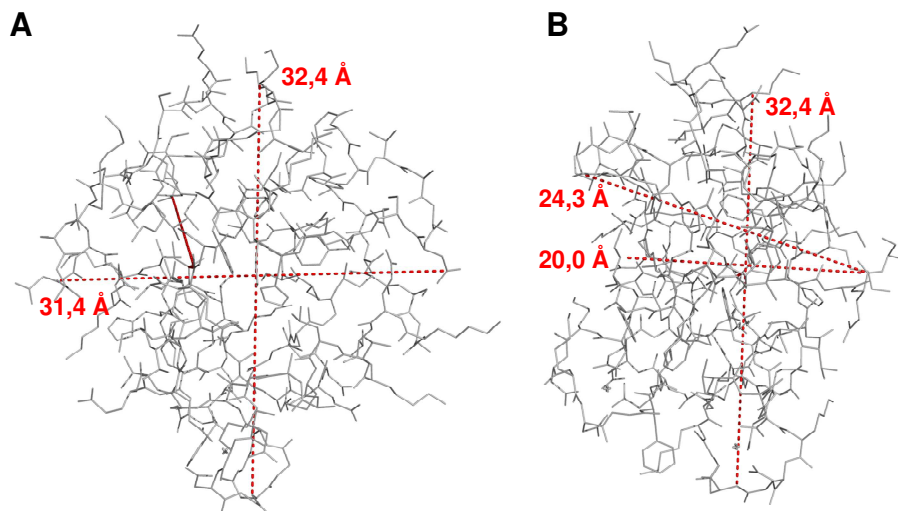


**Abb. I:** Titration von 4  $\mu M$   $TbCl_3$  und 10  $\mu M$  Zarvin mit  $MgCl_2$  bzw.  $ZnCl_2$ . Die Titrations sind analog zu denen in Abb. 3.20 mit  $GdCl_3$  und  $CaCl_2$ . Die entsprechende Kompetitionsleichung konnte bei der Titration mit  $MgCl_2$  (**A**) nicht erfolgreich eingepasst werden, da der Anfangsbereich zu linear ist. Dies ist nicht auf eine inkomplette Ausbildung des chemischen Gleichgewichtes zurückzuführen. Jeder der Titrationspunkte wurde bei einer zweiten Titration über sechs Tage inkubiert und danach gemessen. Das Resultat blieb dasselbe. Eine nichtlineare Regression mit den normalisierten und invertierten Datenpunkten mittels einer Hill-Gleichung ist analog zu den Titrations mit NTA möglich ( $R^2 = 0,9992$ ,  $h = 1,42$ ) und liefert einen  $K_{app}$ -Wert von 61 mM. **B:**  $Zn^{2+}$  scheint im Gegensatz zu  $Gd^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  nur in der Lage zu sein, eines der beiden  $Tb^{3+}$ -Ionen aus dem Zarvin: $(Tb^{3+})_2$ -Komplex zu verdrängen und dies wahrscheinlich aus der CD-Bindestelle. Die Tatsache, dass die Lumineszenzintensität dabei auf etwa 50 % statt auf etwa 85 %, so wie es entsprechend Abb. 3.18B erwartet würde, könnte dadurch erklärt werden, dass der Heterokomplex Zarvin: $(Tb^{3+}, Zn^{2+})$  wahrscheinlich eine leicht unterschiedliche Geometrie der beiden Bindetaschen zueinander aufweist, als der Zarvin: $(Tb^{3+})_2$ -Komplex. Die Position und der Winkel des Phenylalanin 57, über welches die  $Tb^{3+}$ -Ionen indirekt mittels FRET angeregt werden, wird dadurch wahrscheinlich ebenfalls leicht unterschiedlich sein, wie in dem Zarvin: $(Tb^{3+})_2$ -Komplex. Eine geringere Effizienz der indirekten Anregung des  $Tb^{3+}$  in der EF-Bindestelle könnte dadurch erklärt werden, da ein FRET stark abhängig von der Distanz sowie dem Winkel (hier nur bezogen auf den Winkel des aromatischen Ringes des Phenylalanins zu dem  $Tb^{3+}$ ) zwischen Donor und Akzeptor abhängig ist. Der  $K_{app}$ -Wert für die Verdrängung des  $Tb^{3+}$  aus einer der Bindestellen wurde durch nichtlineare Regression mit Hilfe einer monophasischen Kompetitionsleichung (Gleichung 2.4 in Abschnitt 2.25.2) ermittelt (nur die Datenpunkte bis 160 mM  $ZnCl_2$  wurden für die Regression verwendet).

## Anhang J:

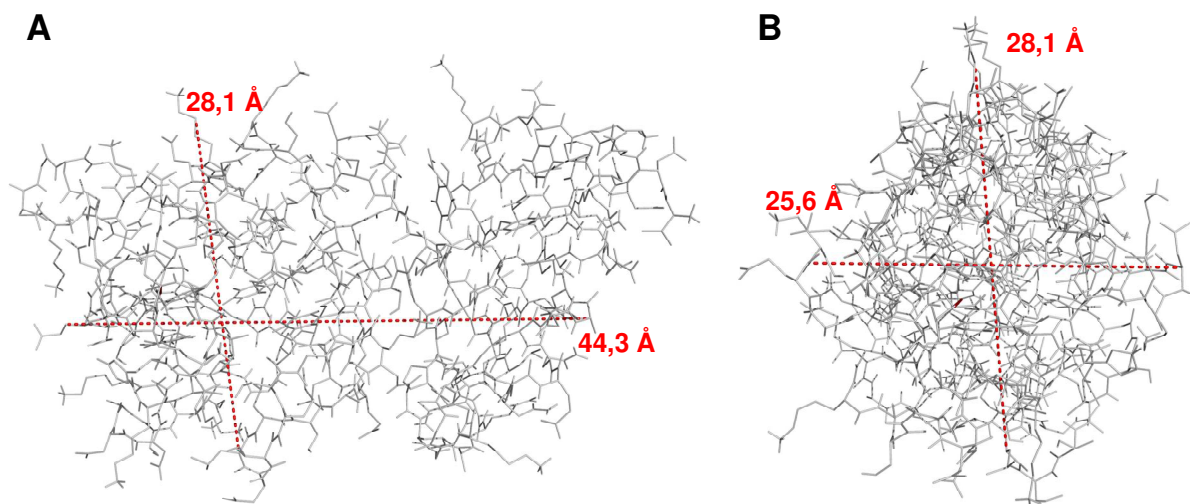
### Verwendete Molekülachsen des Zarvins für die Berechnung der Rotationskorrelationszeiten $\tau_r$ des Proteins

Ausgewählte Achsen basierend nur auf der Parvalbumin-Domäne:



**Abb. J1:** Auswahl dreier in etwa orthogonal zueinander stehender Molekülachsen des S55D/E59D  $\alpha$ -Parvalbumins. **B** ist gegenüber **A** etwa 90° um die 32,4 Å-Achse gedreht. Für die dritte Achse wurde anhand von **B** eine Distanz von ungefähr 23 Å angenommen (unter Zuhilfenahme einer dritten erneut um 90° gedrehten Ansicht). Die Achsen wurden mit Hilfe der Struktur mit der pdb-ID 1S3P ausgewählt.

Ausgewählte Achsen basierend auf Zarvin:



**Abb. J2:** Auswahl dreier in etwa orthogonal zueinander stehender Molekülachsen des Zarvins. **B** ist gegenüber **A** etwa 90° um die 28,1 Å-Achse gedreht. Die drei Achsen wurden zugunsten besserer Orthogonalität leicht korrigiert auf 44,5 Å, 27,8 Å und 25,4 Å.

$$\text{Radius (Parvalbumin)} = 0,5 \times \sqrt[3]{32,4 \text{ Å} \times 31,4 \text{ Å} \times 23 \text{ Å}} = 14,30 \text{ Å}$$

$$\text{Radius (Zarvin)} = 0,5 \times \sqrt[3]{44,5 \text{ Å} \times 27,8 \text{ Å} \times 25,4 \text{ Å}} = 15,77 \text{ Å}$$



## Anhang K:

### Beispiel für die Berechnung der Relaxivität $r_1$ der inneren Koordinationssphäre des Zarin: $(\text{Gd}^{3+})_2$ nach der Grenoble-Methode

Beispielrechnung für 1,5 Tesla mit  $\tau_r = 3,04 \text{ ns}$  und  $\tau_m = 20 \text{ ns}$ :

Gleichungen:

$$\frac{1}{T_{1m}} = R_{1m} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \times \frac{3\tau_c}{1+(\omega_I^2 \tau_c^2)} \quad (\text{vereinfachte Solomon-Gleichung})$$

$$r_1 = \frac{q / [\text{H}_2\text{O}]}{(T_{1m} + \tau_m)} \quad (\text{Gl. 1.4})$$

Berechnung der Korrelationszeit  $\tau_c$ :

$$\tau_c^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_m^{-1} = (3,04388 \times 10^{-9} \text{ s})^{-1} + (2 \times 10^{-8} \text{ s})^{-1} = 378527845,2 \text{ s}^{-1}$$

$$\tau_c = 2,64181 \times 10^{-9} \text{ s}$$

Für die Rechnung wurde der nicht gerundete Wert für  $\tau_r$  benutzt.

Berechnung des Faktors vor dem spektralen Dichteterm der vereinfachten Solomon-Gl.:

Konstante	Bezeichnung	Wert	SI-Einheit
$\mu_0$	Magnetische Permeabilität des Vakuums	$1,2566370613 \times 10^{-6}$	$\text{N/A}^2$
$g_e$	g-Faktor des Elektronenspins	-2,0023193043622	dimensionslos
$\mu_B$	Bohrsches Magneton	$9,27400968 \times 10^{-24}$	$\text{J} \times \text{T}^{-1}$
$\gamma_I$	Gyromagnetisches Verhältnis für das Proton	267513000	$\text{rad} \times \text{s}^{-1} \times \text{T}^{-1}$
$r$	Distanz zwischen $\text{Gd}^{3+}$ und H bei einem $\text{H}_2\text{O}$ in der inneren Koordinationssphäre des Kontrastmittels	$3,1 \times 10^{-10}$	m
$S$	Gesamtspinzustand des $\text{Gd}^{3+}$	7/2	dimensionslos

N: Newton, A: Ampere, J: Joule, T: Tesla

$$\text{Faktor vor spektralem Dichteterm: } 5,83903 \times 10^{14} \text{ rad}^2 \times \text{s}^{-2}$$

Berechnung des spektralen Dichteterms für eine Feldstärke von 1,5 Tesla:

$$\omega_I(1,5 \text{ T}) = 42,576 \text{ MHz/T} \times 1,5 \text{ T} \times 2\pi \times 1000000 = 401269346,5 \text{ rad} \times \text{s}^{-1}$$

$$\tau_c = 2,64181 \times 10^{-9} \text{ s}$$

$$\text{Spektrale Dichte} = 3,73178 \times 10^{-9} \text{ rad}^{-2} \times \text{s}$$

Berechnung von  $1/T_{1m}$  mit Hilfe der vereinfachten Solomon-Gleichung:

$$1/T_{1m} = 5,83903 \times 10^{14} \text{ rad}^2 \times s^{-2} \times 3,73178 \times 10^{-9} \text{ rad}^{-2} \times s = 2178999,909 \text{ s}^{-1}$$

$$T_{1m} = 4,58926 \times 10^{-7} \text{ s}$$

Berechnung der Relaxivität  $r_1$  der inneren Koordinationssphäre:

$$q = 1,3$$

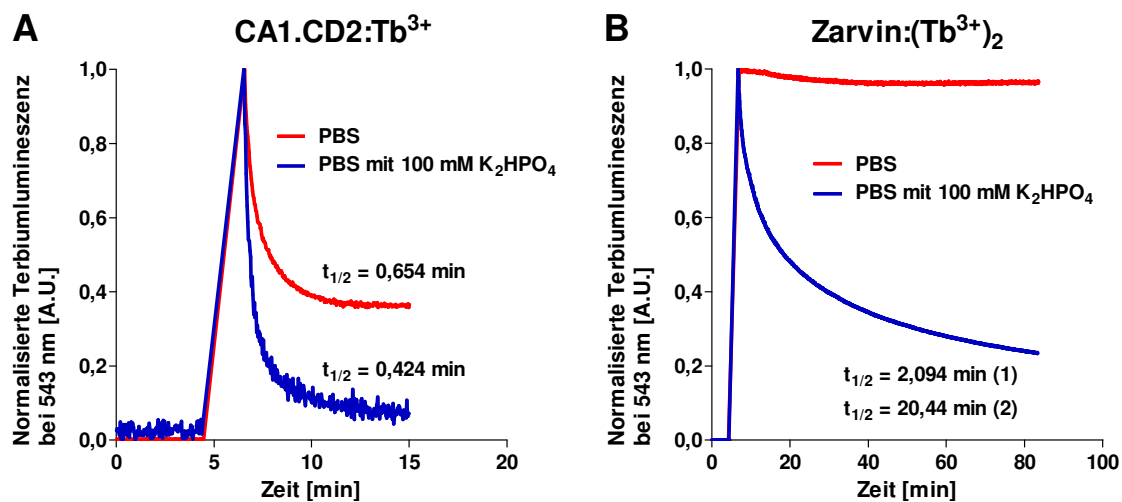
$$T_{1m} = 4,58926 \times 10^{-7} \text{ s}$$

$$\tau_m = 2 \times 10^{-8} \text{ s}$$

$$r_1 = \frac{q / [H_2O]}{(T_{1m} + \tau_m)} = \frac{1,3 / [55500 \text{ mM}]}{(4,58926 \times 10^{-7} \text{ s} + 2 \times 10^{-8} \text{ s})} = 48,908 \text{ mM}^{-1} \times s^{-1}$$

## Anhang L:

**Stabilitätsmessungen des CA1.CD2:Tb<sup>3+</sup>- und des Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>-Komplexes in Phosphatpuffer**



**Abb. L:** Dissoziationskinetiken der Komplexe CA1.CD2:Tb<sup>3+</sup> und Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> in PBS-Puffer, pH 7,4 (~18 mM Phosphat) bzw. in PBS-Puffer mit 100 mM Phosphat, pH 7,4. **A:** Dissoziation des Gemisches aus 55,1 μM des ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit klonierten und gereinigten Proteins CA1.CD2 [97] und 44,9 μM Tb<sup>3+</sup> (vorinkubiert mit höherer Stockkonzentration in 20 mM Bis-Tris, 50 mM NaCl, pH 6,2). Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten bzw. Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression mit einer monoexponentiellen Gleichung ermittelt. Eine Phosphatkonzentration von etwa 18 mM ist nicht in der Lage, das Tb<sup>3+</sup> aus sämtlichen CA1.CD2-Molekülen zu ziehen. Es bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Dissoziation und Reassoziierung mit nicht vollständig dissoziiertem Tb<sup>3+</sup>. **B:** Analoge Messung wie in **A** mit 55,1 μM Zarvin und 94,8 μM Tb<sup>3+</sup> aufgrund von zwei Bindestellen (vorinkubiert mit höherer Stockkonzentration in 20 mM Bis-Tris, 50 mM NaCl, pH 6,2). Die Geschwindigkeitskonstanten bzw. Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression mit einer biexponentiellen Gleichung ermittelt. Unter identischen Bedingungen ist Zarvin:(Tb<sup>3+</sup>)<sub>2</sub> deutlich resistenter gegenüber der Konkurrenz durch Phosphat. Auch bei Zarvin ist eine Abhängigkeit des Dissoziationsgrades von dem Konzentrationsverhältnis zwischen dem Protein und Phosphat zu verzeichnen. Die Proteine in **A** und **B** wurden leicht mit Tb<sup>3+</sup> untersättigt, um ansonsten auftretende Effekte von überschüssigem Tb<sup>3+</sup> auf die Dissoziationskinetik zu vermeiden.

# Danksagung

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Peter Bayer dafür, dass ich bei ihm promovieren durfte, und dafür, dass ich dieses interessante und für die Arbeitsgruppe neue Themenfeld bearbeiten durfte.

Ich danke Prof. Dr. Daniel Hoffmann, Stefan Franke, PD Dr. Dominik Heider und Dr. Oliver Kraff für die angenehme Zusammenarbeit bei dem Projekt.

Besonderer Dank geht an Tina Stratmann, Dr. Anja Matena, Dr. Christoph Lederer, Julia Herfurth, Alma Rüppel und Dr. Jonathan Müller, die mich insbesondere zu Beginn meiner Promotion sowohl in der Theorie als auch in der Praxis unterstützt haben. Anja Matena, Julia Herfurth und Johannes van den Boom danke ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der gesamten AG Bayer danke für eine wirklich tolle Arbeitsatmosphäre und dafür, dass wir immer Spaß zusammen hatten. Ich danke euch auch für die Freizeitaktivitäten, die wir gemeinsam unternommen haben. Eine Gruppe wie euch kann man sich an jedem Arbeitsplatz nur wünschen!

Ebenfalls besonderer Dank geht an meine Familie und meine Freundin Samantha dafür, dass ich immer auf Verständnis und Unterstützung gestoßen bin, wenn es stressige Phasen gab. Ohne euch wäre die Zeit des Studiums und auch der Promotion deutlich schwerer, wenn überhaupt in diesem Umfang möglich gewesen.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

# Erklärungen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung eines modularen und proteinbasierten Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Daniel Grum befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden